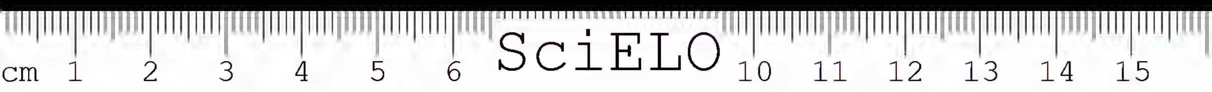
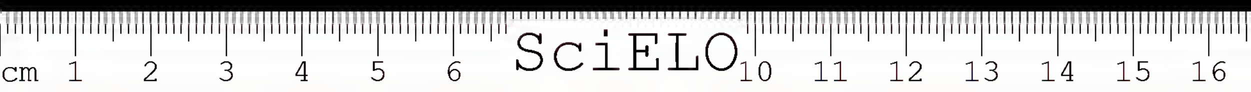
MEMÓRIAS INSTITUTO BUTANTAN

1973

VOLUME 37

SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TECNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO BUTANTAN
SÃO PAULO — BRASIL




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN



Serão fornecidas separatas dos trabalhos publicados nas "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN", solicitando-se nesse caso o obséquio de enviar outras separatas, em permuta, para a Biblioteca do Instituto.

Toda a correspondência editorial deve ser dirigida ao:

INSTITUTO BUTANTAN
Biblioteca
Caixa Postal 65
São Paulo — BRASIL

EXCHANGED DESIRED
PEDE-SE PERMUTA



Composto e impresso em 1974 nas oficinas da
EMPRESA GRÁFICA DA REVISTA DOS TRIBUNAIS S.A.
R. Conde de Sarzedas, 38, fone 33-4181, São Paulo, S.P., Brasil

INSTITUTO BUTANTAN

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Secretário — Dr. Getulio Lima Junior

COORDENADORIA DE SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
Coordenador — Prof. Dr. Otto Guilherme Bier

INSTITUTO BUTANTAN — DIRETORIA GERAL
Diretora — Dra. Jandyra Planet do Amaral

I — DIVISÃO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

Diretor — *Dr. Bruno Soerensen Cardozo*

a) *Serviço de Imunologia*
Diretor — Dr. Raymundo Rolim Rosa

c) *Serviço de Virologia*
Diretor — Dr. René Correa

II — DIVISÃO DE BIOLOGIA

Diretor — *Dr. Alphonse Richard Hoge*

a) *Serviço de Animais Peçonhentos*
Diretor — Dr. Hélio Emerson Belluomini

b) *Serviço de Genética*
Diretor — Dr. Willy Beçak

III — DIVISÃO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS E QUÍMICA

Diretor — *Dra. Alba Apparecida de Campos Lavras*

a) *Serviço de Bioquímica*
Diretor — Dra. Fajga Ruchla Mandelbaum

b) *Serviço de Farmacologia*
Diretor — Dra. Mina Fichman

c) *Serviço de Fisiologia*
Diretor — Dr. Saul Schenberg

d) *Serviço de Química Organica*
Diretor — Dr. Raymond Zelnik



IV — DIVISÃO DE PATOLOGIA

Diretor — *Dr. Jesus Carlos Machado*

a) *Serviço de Fisiopatologia*
Diretor — Dra. Linda Nahas

Serviços Diretamente Ligados à Diretoria Geral

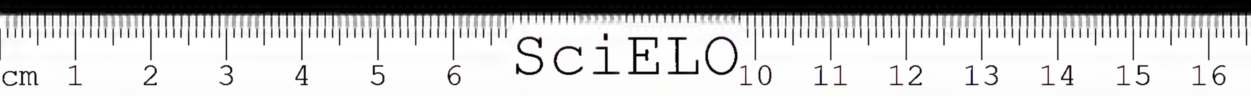
a) *Serviço de Veterinária*
Diretor — Dr. Feres Saliba

LABORATÓRIOS ESPECIAIS:

Laboratório Especial de Bacteriologia Experimental
Diretor — Dr. Ciro Peluffo

Laboratório Especial de Imuno-Biologia
Diretor — Dr. Wilmar Dias da Silva

Centro OMS/OPS de Pesquisa e Formação em Imunologia
Diretor — Dr. Ivan Motta



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1 — *FINALIDADE*

As MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN são publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores. Tem por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos da Biologia e da Medicina, elaborados por especialistas nacionais ou estrangeiros que se enquadrem no REGULAMENTO DOS TRABALHOS.

2 — *REGULAMENTO DOS TRABALHOS*

2.1 — *NORMAS GERAIS*

2.1.1. Os trabalhos devem ser inéditos e destinar-se exclusivamente à revista "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN". Os artigos serão publicados a convite da Comissão Editorial.

2.1.2 *ESTRUTURA DO TRABALHO*

2.1.2.1 *Elementos preliminares*

a) cabeçalho — título do trabalho e nome do autor (es);

b) filiação científica e endereço para correspondência.

2.1.2.2 *Texto*

Sempre que possível deve obedecer à forma convencional do artigo científico:

a) *Introdução* — Estabelecer com clareza o objetivo do trabalho, relacionando-o com outros do mesmo campo e apresentando de forma sucinta a situação que se encontra o problema investigado. Extensas revisões de literatura devem ser substituidas por referências aos trabalhos mais recentes, onde tais revisões tenham sido apresentadas.

b) *Material e métodos* — A descrição dos métodos usados deve limitar-se ao suficiente para possibilitar ao leitor a perfeita compreensão e repetição dos métodos; as técnicas já descritas em outros trabalhos devem ser referidas somente por citação, a menos que tenham sido consideravelmente modificadas.

c) *Resultados* — Devem ser apresentados com clareza e, sempre que necessário, acompanhados de tabelas e material ilustrativo adequado.



d) *Discussão* — Deve restringir-se à apresentação dos dados obtidos e dos resultados alcançados, relacionando-se novas contribuições aos conhecimentos anteriores. Evitar hipóteses ou generalizações não baseadas nos resultados do trabalho.

e) *Conclusões* — devem ser fundamentadas no texto.

Dependendo do assunto do artigo, as divisões acima poderão ser modificadas de acordo com o esquema de trabalho, porém, o artigo deve conter obrigatoriamente:

a) *Introdução;*
b) Desenvolvimento do tema (com as divisões a critério do autor);
c) Conclusão.

Agradecimentos — devem ser mencionados antes das *Referências Bibliográficas.*

2.1.2.3 *Material de Referência*

Todo trabalho deve vir obrigatoriamente acompanhado de:

a) *RESUMO* — um no mesmo idioma do texto, outro em inglês, redigidos pelo(s) próprio(s) autor(s), devem expressar o conteudo do artigo, salientando os elementos novos e indicando sua importância. O resumo na língua em que está redigido o trabalho deve ser colocado antes do texto; e o em inglês no final. Só excepcionalmente excederá a 200 palavras. Os títulos dos trabalhos devem ser traduzidos para o ingles e vice-versa.

b) *UNITERMOS* — Correspondendo a palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo, devem ser em número necessário para a completa descrição do assunto e assinalados com asteristicos os 3 unitermos principais. Para a escolha dos unitermos usar o vocabulário protótipo do campo especializado. *

c) *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS* — Devem ser incluídas apenas as referências mencionadas no texto e arranjadas em ordem alfabética do sobrenome do autor, numeradas consecutivamente.

Periódico:

AMORIM, M. de F., MELLO, R. F. e SALIBA, F. — Envenenamento botrópico e crotálico. Contribuição para o estudo experimental comparado das lesões. *Mem. Inst. Butantan*, 23:63, 1950-51.

* Para as ciências da saúde usar o "Medical Subject Headings", com tradução em português realizada pelo Grupo de Bibliotecários Biomédicos da A.P.B.



Livros

BIER, O. — Bacteriologia e imunologia, 1, 13. ed. Melhoramentos, São Paulo, 1966.

As citações no texto devem ser em números índices, correspondendo às respectivas referências bibliográficas.

Examplos:

As investigações sobre a fauna flebotomínica no Estado de São Paulo, foram feitas em várias ocasiões [1, 3, 4].

... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[2] (1968).

Referências Bibliográficas (correspondentes aos números índices)

1. BARRETO, M. P. — *Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebótomos do Estado de São Paulo* (Diptera Psychodidae); São Paulo, 1943. (Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

2. DISNEY, R. H. L. — Observations on a zoonosis: leishmaniosis in British Honduras. *J. appl. Ecol., 5:19,* 1968.

3. FORATTINI, O. P. — Algumas observações sobre Biologia dos flebótomos (Diptera, Psychodidae) em região da bacia do Rio Paraná (Brasil). *Arq. Fac. Hig. S. Paulo, 8:*15-136, 1954.

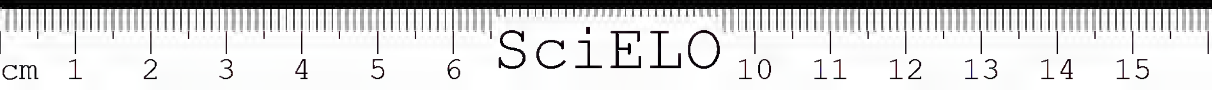
3. FORATTINI, O. P. — Novas observações sobre Biologia de flebótomos em condições naturais (Diptera, Psychodidae). *Arq. Fac. Hig. S. Paulo, 25:*209-15, 1960.

3 — *NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DOS ORIGINAIS*

3.1 — *Datilografia* — Os originais devem ser datilografados, em 3 (tres) vias, com espaço duplo, em uma só face, mantendo as margens laterais com 3 cm aproximadamente. Todas as páginas devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos, no canto superior direito.

3.2 — *Tabelas* — Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas pelo seu título. Os dados apresentados em tabela não devem ser, em geral, repetidos no texto. As notas de rodapé das tabelas devem ser restritas ao mínimo possível e referidas por asteriscos.

3.3 — *Ilustrações* — (fotografias, desenhos, gráficos, etc) — As ilustrações devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como Figuras. Todas as figuras serão identificadas fora da área de reprodução com: número, nome do autor, título abreviado do trabalho, indicação da página de texto onde deverão constar. As legendas devem ser apresentadas em folhas à parte. As ilustrações devem permitir perfeita reprodução em cliches até a redução mínima de 6,3 cm. Os desenhos devem ser feitos em papel vegetal e tinta nanquim preta e as letras com normógrafo, nunca datilogradas.



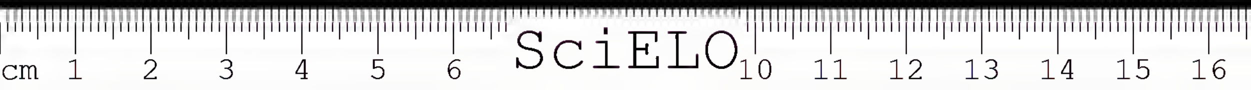
A Revista admite cliches (branco e preto) até 6 no texto, para cada trabalho, devendo os demais ser pagos pelo autor. Para cliches coloridos deverá haver prévia combinação entre a Comissão Editorial e o autor.

De cada trabalho serão tiradas 100 (cem) separatas, devendo o autor pagar as separatas que excedam a esse número, quando solicitar uma quantidade maior. As separatas em excesso devem ser solicitadas quando o manuscrito for encaminhado à Comissão Editorial.

Os trabalhos poderão ser redigidos, além da língua portuguesa, em: inglês, francês e espanhol. Outras línguas ficarão a critério da Comissão Editorial.

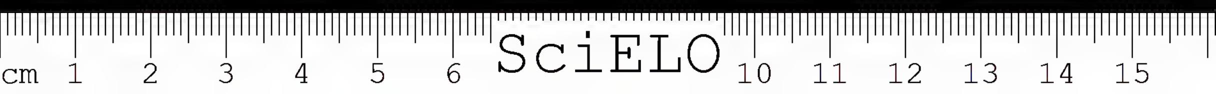
A reprodução total ou parcial dos trabalhos em outros periódicos — *com menção obrigatória da fonte* — dependerá de autorização prévia da Comissão Editorial.

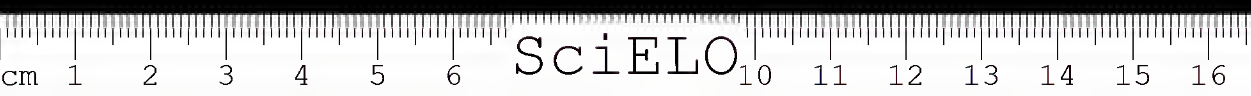
Para fins comerciais, será proibida a tradução e reprodução dos trabalhos publicados pela revista.



MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN

CONTEÚDO





Mem. Inst. Butantan
37: 1-15, 1973

OFIONIMIA AMERÍNDIA NA OFIOLOGIA BRASILIENSE

AFRÂNIO do AMARAL

UNITERMOS: Nomes indígenas. Ofiologia do Brasil.

UNITERMS: Indigenous names. Brazilian Ophiology.

INTRODUÇÃO

O presente tentame de interpretação da pronúncia e possível forma de inúmeras e estranhas vozes e vocábulos ameríndios aplicados à diferenciação de nossos ofídios procura associar o conhecimento biológico haurido do contacto direto de cerca de 70 anos com a ófio-fauna americana aos ensinamentos colhidos da consulta da extensa e dispersa bibliografia relativa às línguas indígenas, sobretudo o Guarani (G) e o Tupi (T) antigos, além de dialetos deste como o Nhêengatu (Nh) e o Brasiliano (Bh) de fase menos recuada de nossa História, a par da Língua Geral (LG) e do Botocudo (Botoc.).

Essa consulta devia necessariamente abranger as obras de numerosos autores que, pela ordem alfabética sobrenominal, podem ser assim lembrados: C. Abbeville, pe. J. de Anchieta, fr. Arronches, P. Ayrosa, pe. L. Barbosa, M. Bertoni, B. Caetano, F. Cardim, A. de Casal, C. Drumond, Saint-Hilaire, A. v. Humboldt, J. Laet, J. Léry, C. Magalhães, G. Marcgrave, F. Martius, C. Monteiro, A. Montoya, fr. Onofre, W. Piso, P. Restivo, B. Rodrigues, T. Sampaio, G. Soares, v. d. Stein, S. Stradelli, G. Tastevin, C. Teschauer, A. Thévet, K. Varnhagen e M. Wied.

As dificuldades inerentes à percepção do justo sentido das vozes íncolas, ouvidas de pequenos grupos humanos disseminados pela imensidão de nosso território — agravadas pela falta de linguagem escrita e de continuidade lingüística e populacional e, ainda, interpretada diversamente de acordo com a origem de cada interlocutor, fosse ele simples viajante, devotado historiógrafo, piedoso catequista, ou meticuloso pesquisador — essas dificuldades (que já haviam sido postas de manifesto desde a obra pioneira de Anchieta em sua memorável *Gramática*, tendo-se agravado com a progressiva extinção das tribos de autóctones) continuam a impedir a confecção de trabalhos que sejam bem aceitos pelos leitores mais exigentes.

Insatisfeito com os resultados colhidos nos primeiros anos de nosso interesse por esse assunto — quando em nossa infância demos de anotar as inflexões da linguagem Nhêengatu (cuja ofionimia, como a do Tupi em geral, é bastante objectiva e de carácter descritivo) — tratamos, desde os idos de 1910, quando éramos mero docente de grego e latim ginasiais, de estabelecer contacto pessoal com luminares da Tupinologia, quais, entre os brasileiros, Theodoro Sampaio, Plínio Ayrosa, Lemos Barbosa e, por último, Carlos Dru-

Endereço para correspondência:
S. Paulo, SP, Brasil
R. da Bela Sintra, 755



mond, Egon Schaden, Herbert Baldus, Aryon Rodrigues e Frederico Edelweiss e, entre os estrangeiros, os nossos amigos paraguaios, prof. Diaz Bordenave e engº. Daumas Ladouce. A todos eles somos agradecido pela orientação e esclarecimentos de cuja falta tanto nos ressentíamos. E que nos levaram a aproveitar tão feliz ensejo para pôr-nos em dia com o progresso que, desde o nosso primeiro ensaio realizado em 1925 (*in* Bol. Mus. Nac., Rio, *2* (2): 1-13, 1926), se registou no conhecimento de novas sutilezas do Tupi-Guarani em nosso meio.

Ao culminar nesta monografia a nossa desvaliosa obra no domínio da Herpetologia resolvemos nela deixar consignadas — sem embargo das muitas limitações que ainda mais se patenteiam neste longo inverno de nossa existência — deixar consignadas as impressões que resultaram de nossos contactos com a ofionimia dos indígenas brasileiros, na esperança de que elas possam por ventura interessar as novas e futuras gerações.

VOCABULÁRIO	VOCABULARY
Nomes indígenas aportuguesados de serpentes Tentame interpretativo da conotação	Portuguese forms of Brazilindian names of snakes Interpretative attempt at their connotation
Leg.: T = Tupi[+] LG = Língua Geral Nh = Nheengatu G = Guarani + (Br = Brasiliano)	
Acutimbóia, Nh *akuti* (cutia)-*mbóia* (serpente), 22[1]: serpente de cotia.	agouti snake *Chironius carinatus* (L)
Arabóia ou *Ararambóia*, T *ará*(r) (arara)-*bói* (serente)-*a*; Nh *arara* (arara)-‘*mbói* (serente)-*a*, 20: serente de arara.	macaw snake *Boa canina* L.
Boiaçu, *Boiuçu*, T ou *Boiguaçu*,[1] LG = (‘*m*)*bói* (serpente)-*wasú* ou *djusú* (grande), 4,6,7,8,64: grande serpente[2].	big snake[+]; ‘boa’ *Constrictor c. constrictor* (L.) *Constrictor c. amarali* Stull
Boichumbeguaçu (*Boichimbèguaçu* ou *Boitimbeguaçu*), LG (‘*m*)*bói* (serpente)-*chin* ou *tĩ* (nariz) *bé*, *pé* ou *peba* (chato) *wasú* ou *djuasú* (grande), 75,76, 77: grande serpente (de) nariz (focinho) chato.	flatsnouted big snake *Micrurus lemniscatus* (L.) *Micrurus spixii* Wagler
Boicininga, T ou *Boicinim*, G *bói* ou ‘*mbói* (serpente)-*siniŋa sinĩ* (tininte, que tine): 96: serpente tininte.	clinking snake *Crotalus durissus cascavella* (Wagler) *Crotalus durissus terrificus* (Laur.) *Crotalus durissus collilineatus* (Amaral)

1. Estes nos. indicam as páginas do original de nossa I.C.S.B.
2. O erudito prof. Aryon Rodrigues (dir. Sec. Ling. Mus. Nac., Rio) assim se manifestou (*in cons.*) a propósito deste nome: “Esta variante da antecedente provém: ou de um dialeto da Língua Geral que tivesse estendido o uso de —*wasú* para depois de consoantes (em lugar de *usú*, como em T) e que teria assim *mbóywasú*; ou de uma substtiuição em portuguûs, por analogia com palavras como *saguĩguasú*, etc.”.

AMARAL, A. do — Ofionimia Ameríndia na Ofiologia Brasiliense.
Mem. Inst. Butantan, 37: 1-15, 1973.

VOCABULÁRIO	VOCABULARY
Boicipó, T (*'m*)*bói* (serente)-*îsipó* (cipó, liana), 22: serpente cipó.	liana snake *Chironius carinatus* (L.) *Eudryas boddaerti* (Sentzen) *Dentrophidium dendrophis* (chlegel) *Philodryas nattereri* (Steindnaeher) *Philodryas psammophideus* (Günther)
Boicorá (*Bacorá*), G *'mboî* (serpente) —+ *korá* (do Port. *coral*), 55 56,66: serpente (côr de) coral.	coral snake *Philodryas trigeminus* (D., B. & D.) *Erythrolamprus aesculapii* (L.)
Boicoatiara T ou *Boicotiara*, G (*'m*)*bói* (serpente)-*kwatiara* (desenhada), 83: serpente desenhada (pintada).	painted snake *Bothrops alternata* (D., B. & D.) *Bothrops cotiara* (Gomes)
Boiguaçu — Vide *Boiaçu*. *Boiobi* ou *Boiobu*, T/G (*'m*)*bói* (serpente)-*obî* (verde), 9,62,65: serpente verde.	green snake *Philodryas aestivus* (D., B. & D.) *Philodryas olfersii* (Lichtens.) *Philodryas viridissimus* (L.)
Boipeba ou *Boipeva*, *Boipé* T/G *Boipèvaçu*, T (*'m*(*bói* (*serpente*)-*peba* (chata)-*asú* (grande), 50: serpente chata/grande serpente chata.	flat/big flat/snake *Xenodon merremii* (Wagler) *Leiosophis gigas* (D., B. & D.)
Boipinima, T (*'m*)*boî* (serpente)-*pinima* (pintada, com pintas), 74: serpente-pintada.	speckled snake *Micrurus frontalis* (D., B. & D.)
Boipiranga, T (*'m*)*bói* (serpente)-*piranga* (côr vermelha), 69: serpente côr vermelha.	red snake *Elapomorphus tricolor* (D., B. & D.)
Boiquira (*Boiquirá*), T (*'m*)*boî* (serpente)-*kira* (*kirá*, gorda), 96: serpente grossa.	thick snake *Crotalus durissus cascavella* (Wagler) *Crotalus durissus collilineatus* (Amaral) *Crotalus durissus terrificus* (Laur.)
Boiuru ou *Boiru*, G (*'m*)*bói* (senpente) -*urú* (atacar, que ataca para comer), 54: serpente comedora (das outras?)-ofiófaga).	eater (ophiophagous?) snake *Pseudoboa cloelia* (Daudin)
Bòitiapó (*nec Boitiabóia*), T (*'m*)*boî-tî* (*îsî*)*pó* (cipó), 22,66: serpente-cipó.	liana snake *Chironius carinatus* (L.) *Oxybelis aeneus aeneus* (Wagler)
Boitiaporana ou *Boitiporana*, Nh (*'m*)-*boy* (serpente)- *tî*(*îsî*)*pó* (cipó)-*rana*, 64: falsa (parecida com) serpente-cipó.	liana-like snake *Philodryas schottii* (Schlegel)
Boiuna, T (*'m*)*bói* (serpente)-(*y*) *una* (preta), 4,54: serpente preta.	black snake *Eunectes murinus* (L.)
Cainana (*Acaninana*), T (*a*)*ka* (cabeqa)-*ni* (pequena)-*nana* (irritada), ou *Caniñaña* (*Caniña*) G (cf Bordenave), 18b, 0: pequena cabeoa irritada.	angry, small-headed (snake) *Spilotes pullatus pullatus* (L.) *Spilotes pullatus maculatus* (Amaral)

VOCABULÁRIO	VOCABULARY
Caissaca ou *Caiçaca*, T *kai(a)* (arder)-(s)*aka* (colmilho) 80: (de) colmilho (presa) que arde, ou faz arder.	burning-fanged (snake) *Bothrops atrox* (L.)
Coatiara, T ou *Cotiara*, G *kwatiara* (a desenhada), 80,83: a (serpente) desenhada.	painted (snake) *Bothrops alternata* (D., B. & D.) *Bothrops cotiara* (Gomes)
Curidju, G — Vide *Sucuri*, (*Su*)*curiju*.	
Cururubóia, Nh *kururú* (sapo)-('*m*)*bóî* (serpente)-*a*, 47,48: serpente de (que come) sapo.	toad snake *Xenodon severus* (L.)
Ibiboboca, T ou *Ibiboca*, G *ibî* (terra, solo)*boboka* (cavar muito) ou *boka* (cavar), 72,75: (a que) cava muito (furadora) a terra.	earth perforator *Micrurus corallinus corallinus* (Wied) *Micrurus lemniscatus* (L.) *Atractus elaps* (Günther)
Jabotibóia, Nh *jabuti* (cágado, jaboti)-('*m*)*bói* (serpente-)*a*, 28: serpente jaboti.	turtle-like snake *Leimadophis reginae* (L.)
Jaçanarana, T +*jasanã* (piassoca, jaçanã)-*rana* (parecido com, falso), 48: parecida com jaçanã.	jaçanã-like snake (or jara(ka)ca-like snake) *Xenodon severus* (L.)
Jararaca, T ou jarará, G *yarâ-ra* (que agarra muito) (*r*)*aka* (colmilho, presa), 87: (a de) presa que agarra muito.	much holding fanged (snake) *Bothrops jararaca* (Wied)
Jaracaçu ou *jararacuçu*, T *yararak*-(jararaca)-*asú/usú* (grande), 88: jararaca grande (maior).	big jararaca *Bothrops jararacussu* (Lacerda)
Jararacambeva T, *jaracabeva*, G *yararáka(m)* (jararaca)-*p/beba* (chata), 47: jararaca chata.	flat "jararaca" *Xenodon merremii* (Wagler)
Jauàcanga, *Tya(g)uá(r)* (onça)-*(a)cáŋa* (cabeça), 7: cabeça de onça (jaguar).	puma,headed (snake) *Constrictor c. constrictor* (L.)
Jeriquá, T (Br) *jiri/jurú* (boca)-*quá* profunda), 47: (de) boca profunda.	(having) deep mouth (snake) *Xenodon merremii* (Wagler)
Jibóia, 7,8,46: Nota: em trabalhos anteriores, havíamos (desde 1928) relegado os étimos invocados por T. Sampaio, C. Teschauer e outros especialistas, por nos parecerem indefensáveis dos pontos-de-vista semântico e biológico; e, no impasse a que chegou a matéria, recor-	rainbow snake + *Constrictor c. constrictor* (L.) *Epicrates cenchria cenchria* (L.) *Epicrates cenchria crassus* (Cope)



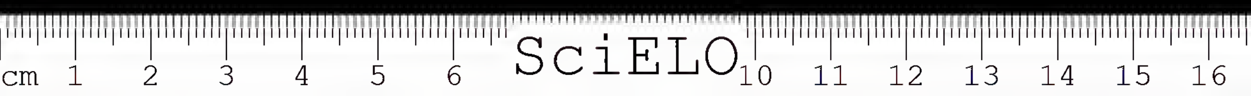
VOCABULÁRIO	VOCABULARY
remos às luzes do nosso perquirente confrade prof. Frederico Edelweiss. Dessa nossa iniciativa resultou o interessante parecer com que o reputado tupinólogo nos brindou (*in litt.*) e de cujo texto trasladamos para aqui os seguintes tópicos: *Serpente de arco-íris*: "*Arco-íris* em tupi é *îyyba*, literalmente *cabo de cunha*, que em composição com (*m*)*boîa*, se apocopou obrigatoriamente em *îyy*, formando inicialmente *îyyboia* que, como vemos, pela lei do menor esforço, se contraiu em *îyboîa*, o nosso *jiboia*". Vide texto in pp. 10-11 da presente e modesta contribuição (+).	*Epicrates cenchria hygrophilus* (Amaral) *Epicrates cenchria polylepis* (Amaral) *Epicrates cenchria xerophilus* (Amaral) *Xenodon colubrinus* (Bünther)
Maracàbóia, Nh *maraká* (chocalho)-(*'m*)*bóîa* (serpente), 96: serpente chocalheira.	rattle-snake *Crotalus durissus cascavella* (Wagler) *Crotalus d. collilineatus* (Amaral) *Crotalus d. terrificus* (Laurenti)
Moçurana, T. *mosú* (enguia)-*rána* (falsa, parecida com), 54: parecida com muçu(m) ou enguia.	eel-like *Pseudoboa cloelia* (Daudin)
Nhuaçu/Nhuguaçùquara, T/G *nhú* (campo)-*açú/wasú* (vasto)-(*q*)*oara* (morador), 24: que vive no campo vasto.	wide field dweller *Thalerophis richardi liocercus* (Wied)
Pepeua, Pepeva (*Pupeba*), Nh *pepeba* (muito chata), 50: a muito chata.	very flat (snake) *Xenodon merremii* (Wagler)
Quiriripitá, G *kwiri-ri* (muito silenciosa)-*pîtá* (pousar), 48: a que pousa silenciosa (dorminhoca).	silent (sleepy)-lyer *Dipsas albifrons* (Sauvage) *Dipsas indica* (Laurenti) *Sibynomorphus* sp., sp.
Sacaìbóia, Nh *sakaí* (ramo seco)-(*'m*) *bóîa* (serpente), 23: serpente-ramo seco.	dried-branch snake *Chironius sex-carinatus* (Wagler)
Suaçu/Suguaçubóia, LG/G *suasú* (veado, cf Edelweiss)-(*'m*)*boî* (serpente)*a*, 9: serpente-veado (veadeira)[2] (*Guacubói*).	deer-snake *Eunectes murinus* (L.) *Constrictor c. constrictor* (L.) *Constrictor c. amarali* Stull *Boa hortulana* L. *Epicrates cenchria cenchria* (L.) *Epicrates c. crassus* (Cope) *Epicrates c. hygrophilus* (Amaral) *Epicrates c. polylepis* (Amaral) *Epicrates c. xerophilus* (Amaral)

2. Quanto ao antecedente deste termo, o douto confrade, prof. F. Edelweiss (Fac. Filos. Univ. Baia, *in* Rev. Inst. Est. Brasil. 1969, 7:45, nota 56) esclarece: "A transformação do *w* em *u* é relativamente comum no próprio tupi clássico. No brasiliano (LB do Norte), *suasú* se fixou definitivamente e assim se incorporou ao português. No guarani, o vocábulo ficou reduzido, por aférese, a *guasú*. O desenvolvimento dialetal do velho têrmo *sygûasú* > *sûgûasu* > *suasú* mostra claramente que nada tem que ver etimologicamente com *soó-asú*-caça grande".

VOCABULÁRIO	VOCABULARY
Sucuri, Sucuriju ou *(Su)curidju*, G/T /*Sucurijuba* ou *Sucuruiuba*, Nh *soo* ou *suú* (morder, que morde)-*kori* (rápido)-*jú* G, *juba* (ou *iuba*) Nh (amarelo) (de barriga) amarela: a de barriga amarela, que morde rápido.	quick-biting and yellow (belly) river (water)-snake 'anaconda'/'ampallagua' *Eunectes murinus* (L.) *Eunectes notaeus* (Cope)
Surucucu, T/G *soo, suú/su(r)ú* (morder), (que morde)-*(k)u(k)ú* (muito, 78: a que morde muito.	*Lachesis muta* (L.)
Surucucùrana, T *surukukú* (surucucu)-*-rána* (parecida com, falsa), 12: semelhante (colorido e folidose dorsal) à Surucucu.	surucucu-(persistent biter)-like (snake) *Helicops angulata* (L.)
Surucù(cu)tinga, T *surukukú* (surucucu)-*tiŋa* (branco), 78: Surucucu branco (claro).	white surucucu (persistent biter) *Lachesis muta* (L.)
Tiapòrana/*(Boi)tiapòrana*, T *('m)bóî* (serpente)-*ti(îsî)pó* (cipó, liana))-*rana* (falsa), 64: falsa serpente-cipó.	liana-like snake *Philodryas schottii* (Schlegel)
Trairabóia, Nh *t(a)reira* (contorcedora)-*('m)bóî* (serpente)-*a*; 36: serpente-traira.	traira-(brook fish)-wriggling snake *Liophis miliaris miliaris* (L.)
Ubiraquá/*Ibiràquára*, G/T *ïbirá* (árvore)-*(q)oara* (morador), 60: a que vive (mora) na árvore.	tree-dweller *Dryophylax pallidus strigilis* (Thunberg)
Uràpiaguara, T *wirá* (*guirá*, pássaro)-*-(u) pi* (ovo)-*awara* (comedor) 23: o que come ovos de pássaros.	bird-egg eater *Chironius fuscus* (L.)
Urutu, G *u(r)ú* (atacar, picar)-*útú* (arremesso), 80: a que pica de arremesso. *Urutu dourado et al.*	thrusting biter *Bothrops alternata* (D., B. & D.) *Bothrops jararacussu* (Lacerda)

NOTAS

Segundo mostramos alhures (*in* Bol. Mus. Nacional, Rio, 1928, 2, 2:6; *et* Biologia e Lingüística, Ed. Edigraf. S. Paulo, 1945: 17,49), ao nome "Jibóia", que a final se confinou à espécie terrestre *Constrictor constrictor* (L.), foram, ainda no começo deste século, atribuidos os sentidos de "cobra d'água" (Th. Sampaio *in* O Tupi na Geografia Nacional, Ed. E. A. A., Bahia, 1918:203: Tupi "gihi-boy") e de "cobra das rãs" (C. Teschauer *in* N. Diccion. Nacional, Ed. Livr. Globo, P. Alegre, 1928:449: — Tupi "gyï-boy") embora tais sentidos antes lembrassem a espécie aquática *Eunectes murinus*.



É certo que G. Soares de Souza, em sua famosa obra Notícia do Brasil (escrita no fim do século XVI, mas só descoberta e publicada por J. M. Conceição Velloso no começo do século XIX), se referiu, no c. CIX, à "gibóia" como sendo serpente que atinge 10 a 12 m de comprimento e vive em rios e lagoas, o que a identificaria como *E. murinus;* todavia, no c. CX, registou novo ofídio com símiles caracteres, ao qual atribuiu outro nome túpico, i. e., "sucuriu" (inconfundível com "jiboia").

Mais despistantes ainda são as alusões feitas às duas volumosas bôidas sob os nomes de "boiguaçu", "jiboia" ou "cobra de veado" e "boi guaçu" ou "cobra veadeira", respectivamente, por W. Piso e G. Marcgravius *in* Historia Naturalis Brasiliae, Ed. F. Hackium, Leida & L. Elzevirium, Amsterdão, 1648, c. III *et* c. XIII, fig...

A este respeito cumpre-nos lembrar os seguintes fatos:

1. A espécie terrestre nutre-se, preferentemente, de roedores (musaranhos, ratos e outros), preás, mocós, lebres, pacas e cutias, além de pequenos veados, alimento que lhe é compatível com o tamanho e particular ecologia; assim, ela poucas vezes recorre à constrição exceto quando apanha, p. ex. na orla da caatinga, onde costuma caçar, algum veado "Suaçu-berá" (*M. simplicornis*) — donde o nome de "cobra-de-veado", repetido por Marcgrave e M. Wied ou, no campo circunjacente a lugares habitados, uma ou outra cabra ou cabrito.

2. A espécie aquática (anfíbia) é onicarnívora, comendo, irrestritamente, quando jovem: peixes e rãs; e, mais tarde, aves, porcos, veados e outros animais, de acordo com o tamanho de seu corpo e aparelho digestivo e com as facilidades de seu duplo habitat; porisso, ela geralmente recorre à constrição.

3. Linnaeus foi talvez induzido a aplicar, em seu Syst. Naturae (1758) o nome *murina* à espécie aquática, pelo carácter de caçador de ratos ("murium insidiator") que Seba atribuiu a este ofídio na obra R. Natur. Thesauri (1735), táb. 29, cuja fig. 1 chegou a mostrar um rato ao lado (embora em plano inferior) da serpente.

4. Visivelmente impressionado com os erros cometidos, em conhecidas obras clássicas no gênero, por vários autores (sobretudo Linnaeus *in* Syst. Naturae, 1758; Laurentius, *in* Synops. Reptilium, 1768; Lacépède *in* Hist. Naturelle, 1789; Latreille *in* H. Nat. Reptiles, 1801; Schneider *in* Hist. Amphibiorum, 1801; Daudin *in* Hist. Nat. Générale, 1803; e Merrem *in* Tent. Syst. Amphibiorum, 1820), Schlegel *in* Essai, 1837, tentou seriamente sistematizar a questão e estabelecer — à luz de dados menos incorretos sobre o *habitat* de várias e importantes bôidas — melhor base para a distinção de tais serpentes, cujas definições se basearam sobretudo em velhos exemplares mal conservados em coleções de museus. E, por coincidência, ao tratar de *murina*, ele chegou a dizer que Lineu "a donné à cette espèce un nom assez vague que les auteurs cependant ont conservé".

5. Quanto à distinção entre essas duas conspícuas espécies, Wied, sendo, ao lado de W. v. Eschwege (*in* J. v. Brasilien, Weimar, 1818, 2:276), dos pou-

cos cientistas-viajantes que travaram conhecimento direto com tais serpentes *in vivo* e no *habitat* natural, conseguiu indicar reais diferenças morfo-biológicas entre *murina* (sob a designação de *aquatica*) e *constrictor*. Todavia no ulterior preparo do texto de suas notáveis monografias (Reise d. Brasilien, 1820; Beitr. zur Naturgeschichte v. Brasilien, 1825; Abbildung, 1831), Wied incluiu, na descrição de *constrictor*, particularidades da "cobra de veada" (sic). Quanto a esta expressão lusitana, que primeiro surgiu na citada obra de Piso e Macgravius (1648), nossas pesquisas herpetológicas e lingüísticas conduzem-nos a admitir que esses autores, ao versarem nossas "bôidas", foram induzidos a êrro por duas expressões regionais de origem túpica, a saber:

a) "Boiaçu" T, cujo sentido de "grande serpente", aplicável à *constrictor* (ou serpente grande, cujo comprimento alcança quase 5 m), corresponde em Botocudo a "*kuong-kuong* (onomatopêico) — *gipakiu*" (cujo 2.º termo significa "grande"). E, segundo sabemos, *C. constrictor*, em seu *habitat* sub-xerofítico a xerofítico é uma das "serpentes de veado" (serpentes veadeiras), pois chega a comer até *M. simplicicornis*: guaçu-berá (*) A par desta forma, própria da zona do dialeto brasiliano (típico, mais recente e usado no Norte), existe — desde NO (Rondônia) até S de Mato Grosso — a forma "mbôiguaçu G."

b) "*Mbôiguaçu*" G, conforme mostrou o confrade prof. F. Edelweiss (*in* Rev. Inst. Estudos Brasileiros 1969, 7: 40, 45), realmente significa "cobra-veado" (=veadeira) e não "cobra grande"; isto, porque tal guaçu teria vindo de "*syguasu* > *sugûasu*" (em G, por aferese, surgiu "gûasú" > "suasú").

Ora, o estudo biológico (eco-trofo-lógico) indica que a espécie aquática (ou anfíbia) *E. murinus* é higrófila, vive no meio da mata e perto dos rios, nutrindo-se de mamíferos (e até de anfíbios, peixes e aves), alguns de certo porte, quais os veados conhecidos como "suaçu-êtê ou pitã" [1] (*M. americana*) e "suaçu-pororoca (*M. rufina*). Assim, esta espécie seria também uma das "serpentes de veado".

— A esta luz, a *sp.* terrestre *C. constrictor*, sendo Jibóia", é também "boiaçu" e uma das "mboîguasu" ou "boi-suasu" (conforme a região).

Nota — Em face destes dados, pode-se compreender a perplexidade em que se teria achado — na execução da árdua tarefa de comentador de parte da obra de G. Marcgrave (*in* Hist. Nat. do Brasil. Trad. port. Ed. Mus. Paulista, S. Paulo, 1942: LXXXIV, n.º 711) — o nosso distinto e estudioso colega e confrade, prof. P. Sawaya (Dep. Fisiol. Zool. USP), ao omitir ou dissociar o aspecto biológico (ambiência e alimentação) e lingüístico (forma e sentido dos nomes) na destrinça das referidas bôidas, referindo-se apenas: 1.º) aos esporões (unhas para-anais, encontradiças em todas as nossas espécies desta família: remanescentes dos membros pélvicos) que Marcgrave registou

(*) No NE chamam 'guazu-berá(ba)' a este cervo, de pelo reluzente

(*) Na monografia "Serpentes gigantes" (*in* Bol. Mus. Goeldi, 1948, 8:211-) mostrámos que *murinus* — cujo comprimento chega a atingir 12 (ou 14) m — recebe, em sua extensa área ecológica, os nomes vulgares de Sucuri, Sucuriu, Sucuriju, Sucurijuba, Boiuna, Viborão e outros.

(1) No NE chamam 'guazu-pitã(ga)' a este cervo, de ventre ferrugíneo.

em sua "Boi guacu" (sic), isto é, a *sp. C. constrictor;* 2.º) ao jogo de manchas dorsais escuras e arredondadas, que é próprio da *sp. E. murinus,* a qual os Botocudos chamam "ketomen-iop", sendo "iop" = água.

Com relação ao sentido histórico que a evolução lingüística emprestou a estas duas espécies conviria talvez lembrar que J. de Laet em sua obra considerou a "Jiboia" (555) "omnium serpentum quos hace regio fert maximus" (a maior nesta região) e a "Sucuri" (576) "omnium anguium longissima et pulcherrima".

e) A par destas espécies de bôidas outras ha que também recebem o nome de (cobra) ou "serpente de veado", a saber: 1.ª — na região amazônica — onde nascemos e, na infância nos habituamos a coletar ofídios para o Museu Goeldi — ouvimos chamarem "Suaçubóia" (serpente veadeira) à *sp. Boa hortulana,* conhecida algures como "Mirambóia" (Nh. *"ambirá* = pau, árvore — *(m)boî* = serpente), forma dendrícola e onicarnívora (compr. até 2m); 2.ª — na bacia do Paraguai denominam "guasuboî" = serpente veadeira à conhecida *Salamanta (Epicrates cenchria),* a qual chega a ter de compr. 1,8 m, possuindo mais ou menos os hábitos ecológicos e alimentares que a *C. constrictor,* inclusivamente caçando até pequenos veados "Suaçu-berá" (*M. simplicicornis*).

— *Síntese* — Fixadas estas noções quanto aos aspectos herpetológicos, biológicos e geográficos a par dos lingüísticos de tão complexa questão, poderíamos dizer que, em nosso fraco entender, cumpre considerar:

1.º) Que têm caráter restrito ou especial os nomes vulgares: *Jibóia* ou *Boiaçu* T — aplicados à espécie *Constrictor constrictor* (reservando-se *Mboî-gûasu* antes à subsp. *C. constrictor amarali,* do S. e S.O. do Brasil até o vale do Paraguai) e *Sucuri* (e compostos) ou *Boiuna,* aplicados à espécie *Eunectes murinus,* reservado o nome *(Su)curidjú* G para a sua congenérica *E. notacus* ou *Ampallagua* do Paraguai; *Mira(m)boîa* — aplicado à espécie dendrícola *Boa hortulana* para a mais conhecida "Cobra-de-veado"; e *"Salamanta"* ou *"Jiboia-furtacôr"* para a campesina *Epicrates cenchria.*

2.º) Que tem carácter mais amplo ou geral as designações *'Boî-suasú'* T ou *'Mboî-guasú'* G, bem como *'Guacu-boia'* ou *'Sugûaçu-mboi'* e formas variantes, que ocorram em vasta área de dispersão zoo-geográfica, com o sentido, proposto pelo prof. F. Edelweiss, de (serpente ou) 'Cobra-veado'.

Aditamento — Seja-nos lícito agora divulgar nossa opinião, baseada em longos anos de experiência com estes intrincados problemas, sobre a maneira de harmonizar os dados históricos com os biológicos, constantes do seguinte tópico do Vocabulário na Língua Brasílica (Ms fg. 3444 Bibl. Nac. Lisboa, rev. pelo prof. C. Drumond, T 952/3, I:76): "Giboya grandissima da terra, dagoa maior que todas, Çucurijú,engolē antas e veados e toda a mais caça". Mediante simples pontuação adequada aos imperativos herpetológicos, te-lo-íamos tornado compreensível e aceitável, assim: "Gibova, grandissima da terra; dagoa maior que todas Çucurijú: engolē antas, veados e toda a mais caça".

Esclarecimentos — Corroborando a notável argumentação constante do parecer do professor da Universidade Federal da Bahia, lembraríamos, *data venia,* os seguintes pormenores hérpeto-lingüísticos:

a) qual seja a incidência dos raios solares sobre a pele (sobretudo quando recém-exuviada) de certas bôidas e serpentes afins, a irridescência que nela se nota é de causar até admiração, e dos povos não tem passado despercebida;

b) a própria observação popular, baseada nesse aspecto da pele, chegou ao ponto de aplicar o nome de 'Giboia furta-cor' à espécie *Epicrates cenchria* e às diversas raças por nós assinaladas ou descritas (*in* Mem. Inst. Butantan 1954, 26:227-247) a saber: *crassus* (C. e S. do Brasil), *xerophilus* (N. E. do Brasil), *hygrophilus* (Vale Rio Doce, E. Santo) e *polylepis* (N. O. Minas Gerais e S. E. Goiás), além da raça típica *cenchria* (Guianas e Vale do Amazonas, Brasil) e quatro outras registadas alhures, devendo notar-se que o próprio Wied (*in* *B e i t r.*) já mostrara que o nome 'Jiboya' se aplica à *sp. E. cenchria* na costa oriental do Brasil, o que reforça o argumento de que é a iridescência da pele que nestas serpentes levou os indígenas a chamarem-n'as jiboia;

c) no S.E. dos E.U.A. chamam "Rain-bow snake" (serpente arco-iris) a espécie de Colúbrida primitiva *Abastor erythrogrammus;*

d) na famosa monografia ilustrada que o prestimoso prof. R. Ditmars publicou no Bronx Park de Nova York a respeito de "Snakes of the World", a gravura relativa a *E. cenchria* traz na legenda a seguinte explicação: "Gliding into the sun the reptile is transformed. As the light catches the upper surface at certain slants, patches of iridescence glow in green and blue, like the wings of the morpho butterfly...".

A esse dedicado colaborador, que chefiou a Divisão Neárctica do Antivenin Institute of America que fundamos na Pennsylvania e dirigimos através de 3 Estações, 4 Serpentários e 7 Laboratórios para servir os Estados Unidos e a América Central, bem como ao nosso saudoso e estimado amigo, prof. Thomas Barbour (diretor do Departamento de Biologia e Museu da Univ. de Harvard) que chefiou, na fase mais brilhante de sua vida, a Divisão Neotrópica do A.I.A., e a todos os outros cientistas, civis e militares, que colaboraram como membros do nosso grupo de pesquisa, a todos aqui deixamos consignados o nosso reconhecimento e apreço pelos serviços que de todo o cração prestaram em benefício da Ciência e da Humanidade. (*)

(*) Além do Dr. R. Ditmars (então chefe do Dept.º Herpetológico e Serpentário do J. Zoológico de Nova York) e do Prof. Dr. Th. Barbour (também chefe da Secção Biológica do Harvard Institute for Tropical Biology and Medicine), os outros membros proeminentes desse grupo de cientistas eram os seguintes:

a) *Pesquisa e Divulgação*: Cel. M. L. Crimmins, Dr. R. E. Scott e Maj. Dr. W. C. Cox (Corpo Médico do Exército dos EUA) no Texas até Rio Grande: Eng.º L. M. Klauber, hérpeto-ecologista (J. Zoológico e Serpentário de San Diego) na Costa do Pacífico; Dr. C. T. Vorhies (Dept.º Biológico da Universidade do Arizona), nas Montanhas Rochosas; Dr. N. Thigerger (dirigente do J. Zoológico e Serpentário de Nova Orleans), na zona do Golfo do México; Sr. G. P. Vierheller (dirigente do J. Zoológico e Serpentário de S. Luis, Mo.), no Vale do Mississippi; Dr. T. S. Githens, imuno-farmacologista (diretor-assistente: Labs. Centrais de Produção e Controle), na Pensilvânia e Mts. Allegheny; Sr. R. E. Stadelman (chefe da Estação e Serpentário de Tela), Honduras, América Central.

b) *Conselho Consultivo*: Prof. Dr. Hans Zinsser (Escolas de Medicina e de Saúde Pública, Universidade de Harvard, em Boston; Prof. Dr. Howard Kelly (Universidades de Johns Hopkins e de Michigan), em Baltimore; Dr. William Deeks (chefe do Dept.º Médico e Hospitalar, United Fruit Co.), em Nova York e América Central; Cel. Dr. Joseph Siler (Corpo Médico do Dept.º de Saúde Militar), em Washington; Dr. Herbert Clark (diretor do Gorgas Memorial Institute for Tropical and Preventive Medicine, em Ancón), no Panamá.

Parecer — Por fim, aproveitamos o ensejo para reproduzir na íntegra os trechos do parecer que, a pedido nosso, formulou o prof. F. Edelweiss a propósito do ofiônimo 'Jibóia':

"Tanto as lendas quanto os vocabulários de considerável número de tribos sul-americanas confirmaram a presença da *cobra* em funções lendárias; ela aparece aí principalmente identificada com o *arco-íris*. Logo no *guaraio*, um dialeto tupiguarani muito puro da Bolívia, mais chegado ao tupi antigo do que o guarani de Montoya, *mboî — cobra* é sinônimo de *arco-iris*.

Nas Gùianas e no Amazonas a *(e)kéime — cobra grande* designa o *arco-iris*. No Chaco e no Paraguai, entre os bororos do Mato Grosso como entre certos índios dos Andes o *arco-iris* ainda é uma cobra por vêzes indeterminada, por vêzes identificada com a *sucuri*. Mesmo entre os botocudos o *arco-iris* continuou sendo provocado por uma *cobra*.

Essa verificação constitui a chave para a solução da etimologia da palavra *jiboia*.

Arco-íris em tupi é *îyyba*, literalmente *cabo de cunha*, que em composição com *(m)boîa* se apocopa obrigatoriamente em *îyy*, formando inicialmente *îyyboia*, que, como vemos, pela lei do menor esfôrço, se contraiu em *îyboîa*, o nosso *jiboia*.

O têrmo deve ser relativamente novo, porque não o encontrei em nenhum dialeto *guarani*. Talvez tenha surgido por influência de vizinhos, o que é muito comum.

A *via-láctea* p. ex. chama-se em tupi *tapií-rapé* (*caminho de tapir*). Tradução idêntica tem o têrmo para *via-láctea* em dialetos de outras famílias lingüísticas, naturalmente por efeito de identidade de ambiente e raciocínio."

N O T E S

Introduction

As we have shown elsewhere (*in* Bol. Mus. Nacional, Rio 1928, 2, 2:6; *ct* Biologia e Lingüística, Ed. Edigraf., S. Paulo, 1945:17,49), the name 'Jibóia' as finally confined to the terrestrial boid *Constrictor constrictor* (L.) was considered, early in this century, by some authors as meaning 'water snake' or 'frog snake (Th. Sampaio *in* O Tupí na Geografia Nacional, Ed. E.A.A., Bahia, 1918:203: — Tupi 'gihi-boy'; C. Teschauer *in* N. Diccion. Nacional, Ed. Livr. Globo, P. Alegre, 1928:449: — Tupi 'gyĩ-boy') in spite of such a meaning rather fitting the aquatic species *Eunectes murinus*. It is true that. G. Soares de Sousa in his famous monograph Notícia do Brasil (as written late in the XVI century but only discovered and published by J. M. Conceição Velloso early in the XIX century) referred to 'gibóia' as a snake reaching 10 to 12 m in lenght and living in rivers and lakes, thus identifiable with *E. murinus*, in c. CIX; but he registered in c. XX another snake with similar characters under a different Tupi name, e. g., "sucuriú (unconfusable with 'jibóia'). Still more

been misled, in their identification of our "giant boids", by two regional names of Tupi or Nhenngatu origin, to wit:

a) 'Boiaçu' T whose meaning 'big snake' applies to *C. constrictor* (as a big snake it reaches nearly 5 m in length) corresponding in Botocudo dialect to 'kuong-kuong (onomatopaic hissing)- gipakiu', apparently meaning 'big hisser'. As we know, in its sub-xerophytic to xerophytic habita *C. constrictor* is really one of the deer-eating snakes since it can swallow even a 'guaçu-berá' (*Mazama simplicicornis*). Besides this vulgar ophionym, prevailing in the section of the 'brasiliano' dialect (more recent Tupy as used in N. Brazil), another form 'mbôiguaçu' is found from NW to S. Mato Grosso (Rondonia southwardly).

b) 'Mboîguaçu' G, *in* Prof. F. Edelweiss, authoritative interpretation (*in* R. Inst. Estudos Brasileiros, 1969, 7:40,45), really means 'deer-snake', not 'big-snake', since this 'guaçu' seems to have come from 'syguasú > suguasú > suasú, (through apheresis, the form 'guasú' is used in Guarany).

As a matter of fact, biologically (ecologically and trophologically), *E. murinus* [1] is hygrophilic, living in the forest near rivers and feeding on mammals (even on amphibians and birds) eventually on large size animals such as the deer known as 'suaçuêtê or- pitã' (*M. americana*) and 'suaçu-pororoca' (*M. rufina*). Therefore, *murinus* is also one of the 'deer-snakes'.

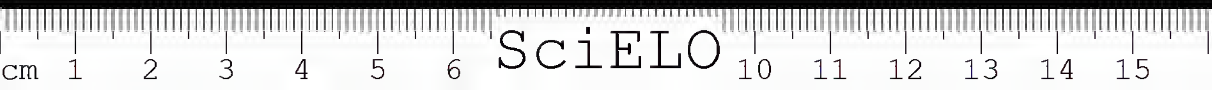
In this ligth, the ground specias *C. constrictor,* besides being the 'jibóia', is also one of the 'mbôi-guaçu' or 'boî-suasú' snakes.

Note — All these data lead us to think of the perplexity in which our nost distinguished colleague and confrère, prof. P. Sawaya appears to have found himself while undertaking the arduous task of commenting on one of the chapters of G. Marcgrave's work (*in* Hist. Nat. do Brasil — Port. edition, Mus. Paulista, S. Paulo, 1942, LXXXIV, N.º 711): besides omitting or dissociating the environmental and feeding aspects from the linguistic feature (forms and meanings) of such names of our most conspicuous boids, he preferred to mention but a) the para-anal spurs, common to all of the local species of *Boidae* and considered as *reliquat* of their pelvic limbs, which, by the way, were registered by Marcgrave in his 'Boiguacu' (sic) with the acception of *C. constrictor;* b) the distribution of the dark, roundish dorsal markings so characteristic of *E. murinus,* that the Botocudos call 'ketomen-iop' ('iop' meaning 'water') as distinct from their 'kong-kong gipakiu'.

In connexion with the historic connotation wherewith the linguistic evolution has associated both of these species, it might be pertinent to remember that J. de Laet in his work already considered (555) the 'jibóia' as "omnium serpentum quos haec regio fert maximus" whilst he called (576) the 'sucuri' "omnium anguium longissima et pulcherrima".

c) Besides both of these species, other boids are listed under the name of 'deer snakes' to wit: 1 — in the Amazon region — where we were born

(1) In our monograph 'Serpentes gigantes' (Giant snaks: *in* Bol. Mus. Goeldi, 1948, 8:211) we showed *E. murinus* (whose total length may reach 12, perhaps 14 m) to receive in its wide ecologic range the common names Sucuri, Sucuriu, Sucurijuba, Boiuna, Viborão and others.



and, still as a student in a Belém primary school, were used to collecting ophidians for Goeldi Museum — we heard people to call 'suaçubóia' (deer-snake) also *Boa hortulana*, elsewhere known as 'mirambóia' (Nh '(a)mbira' = wood, tree-'mbói' = snake) and so a dendricolous and omniearnivorous species sometimes reaching 2 m in length; 2 — in the Paraguay valley natives call 'guaçuboi' = deer-snake the well known *Epicrates cenchria* ('salamanta' of the Portuguese colonists), reaching 1,8 m in length and having the same ecologic and tropologic habits as *C. constrictor*, including catching small 'suaçu-herá' deer (*M. simplicicornis*). Therefore, these snakes compete with each other in environment and feeding, besides in the iridescence of their skin, as we shall see later on.

Synthesis — Based on these notions regarding the herpetologic, biologic (eco- and tropho-logic), geographic and — linguistic aspects of such a complex question, we should say that, in our modest opinion, the following points deserve consideration:

1st) That the character is restrict or special of the vulgar names 'jibóia' and 'boiaçu' T as applied to the species *Constrictor consrictor* ('mboîgûasu' being rather reserved for the subsp. *C. constrictor amarali*, from S and SW Brazil to Paraguay valley); 'sucuri' (and derived compounds) and 'boiuna' as applied to the species *Eunectes murinus*, '(su)curidju' being reserved for its congeneric sp. *E. notaeus*, called 'ampallagua' in Paraguay; 'mirambóia' as applied to the dendricolou *Boa hortulana*, that is, the most generally know as 'deer-snake'; and 'salamanta' or 'color jibóia' as applied to the field-dweller *Epicrates cenchria*.

2nd) That the character is wide and general of the vulgar names 'boî-suaçu' T or 'mboî-guaçu' G as well as 'guaçu-boia' or 'sugûasú-mboî' and allied forms occurring in a wide area of geographic dispersion and hearing the name 'deer-snake' as proposed by prof. F. Edelweiss.

Complement — May we now give our opinion, on the basis of our trying experience with such intricate problems, about the manner of harmonizing the historic and the biologic data as found in the following paragraph of the "Vocabulario na Lingua Brasilica" (Ms. fg. 3444 Bibl. Nac. Lisboa, rev. by prof. C. Drumond, T 952/3, I, 76): "Giboya grandissima da terra, dagoa maior qeu todas, Çucurijú, engole antas e veados e toda a mais caça". Simply, by adpting the punctuation to the herpetologic facts, that paragraph might be rendered both comprehensible and acceptable, thus: "Giboya, grandissima da terra; dagoa maior que todas, Çucurijú: engolẽ antas, veados e toda a mais caça".

Enlightenment — In confirmation of the arguments brought forth in prof. F. Edelweiss' brilliant report we should remind, *data venia*, the following herpeto-linguistic facts:

a) depending upon the angle of incidence of the sun rays on the newly shedded skin of certains boids and allied primitive forms, the iridescence thus produced is so wonderful that it has not passed unnoticed even to the lay people;

b) the popular observation itself as centered on such skin aspect caused tho name 'raimbow boa', to be given to *Epicrates cenchria* and the various subspecies we have described (*in* Mem. Inst. Butantan 1954, 26:227-247) to wit: *crassus* (C. and S. Brazil), – *xerophilus* (NE Brazil), *hygrophilus* (Rio Doce valley, E. Santo) and *polylepis* (NW Minas Gerais and SE Goiás), besides the typical race *cenchria* (Guyanas and Amazon Valley, Brazil) and the other four races registered elsewhere, it being timely to register Wied's information (*in* Beitr.) concerning the application of the name 'jibóia' to *E. cenchria* along the E. coast of Brazil: all these facts reinforce the argument whereby the skin iridescence led the natives to give these snakes the name 'jibóia';

c) in SE North Amrica the primitive colubrid *Abastor erythrogrammus* is known as the 'rain-bow snake';

d) in the famous and illustrated monograph the popular herpetologist dr. R. Ditmars (of Bronx Park, N.Y. City) published on the "Snakes of the World" the figure of *Epicrates cenchria* is thus explained: "Gliding into the sun the reptile is transformed. As the light catches the upper surface at certain slants, patches of iridescence glow in green and blue, like the wings of the morpho butterfly...".

To that devoted confrère and collaborator as chief of the Nearctic Division of the Antivenin Institute of America which we have founded in Pennsylvania, and directed through 3 Stations, 4 "Serpentaria" and 7 Laboratories and organized to serve the USA and C. America) as well as to our esteemed friend, the prominent prof. Thomas Barbour – who led in a part of his life the A.I.A. Neotropic Division – and all the other co-workers and members of our staff, we wish here to present the tribute of our "saudade" and thankful appreciation of the invaluable service they so heartfully rendered in benefit of Science and Mankind. (*)

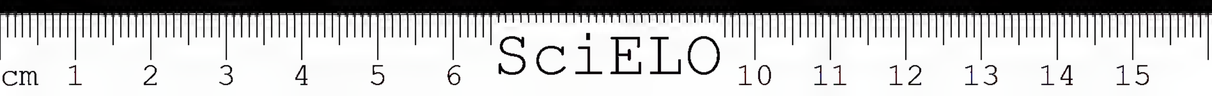
Finally, we are using this opportunity to quote the paragraps of the report prof. F. Edelweiss presented as regards the ophionym 'jiboia' (*Vide* Original Text in Portuguese: pp. 10 and 11).

(*) Besides Dr. R. Ditmars (then chief, Herpetological Dept. and Serpentarium of the N. Y. Zoological Garden) and Prof. Dr. Th. Barbour (also chief, Biological Section of Harvard Institute for Tropical Biology and Medicine), the other outstanding members of that group of scientists were the following:

a) *Research and Divulgation*: Col. M. L. Crimmins, Dr. R. E. Scott and Maj. Dr. W. C. Cox (US Army Medical Corps), in Texas to Rio Grande, Mexico; Engr. L. M. Klauber, herpeto-ecologist (San Diego Zoological Garden and Serpentarium), Pacific Coast; Dr. C. T. Vorhies (University of Arizona Biological Dept.), Rockie Mts.; Dr. N. Thiberger (Director, New Orleans Zoological Garden and Serpentarium), Gulf of Mexico; Mr. G. P. Vierheller (chief, St. Louis Zoological Garden and Serpentarium), Mississippi Valley; Dr. T. S. Githens, immuno-pharmacologist (assistant-director, Production and Control Central Laboratories), Pennsylvania to Allegheny Mts.; Mr. R. E. Stadelman (chief, Station and Serpentarium at Tela), Honduras, Central America.

b) *Advisory Board*: Prof. Dr. Hans Zinsser (Harvard University Schools of Medicine and Public Health), in Boston; Prof. Dr. Howard Kelly (Universities of Johns Hopkins and Michigan), in Baltimore; Dr. William Deeks (director, Medical Dept. and Hospitals, United Fruit Co.), in New York City and Central America; Col. Dr. Joseph Siler (US Army Medical Corps and Surgeon General's Office), in Washington; Dr. Herbert Clark (director, Gorgas Memorial Institute for Tropical and Preventive Medicine), in Ancón, Canal Zone, Panama.

Recebido para publicação em 31/VII/73.
Aceito para publicação em 01/VIII/73.




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
37: 17-42, 1973

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO ÁCIDO BÓRICO COMO ANTISSÉPTICO DE SANGUE CONSERVADO

BRUNO SOERENSEN

RESUMO — Estuda-se as possibilidades do uso do ácido bórico como antisséptico de sangue conservado. Determinou-se a atividade antibacteriana em plasma e sangue humano mantido a 4-6°C e contaminados propositadamente; a influência das diferentes concentrações na preservação de hemacias conservadas a 4-6°C e finalmente a atividade tóxica de amostras de sangue contaminado contendo ácido bórico como antisseptico. Foram utilizadas nas provas cepas bacterianas psicrófilas isoladas de sangue contaminado, sendo 12 do gênero *Pseudomonas*, 3 do gênero *Enterobacter* e 6 do gênero *Bacillus*.

A atividade bacteriostática do ácido bórico no plasma corresponde às concentrações de 0,12 a 0,25 g%, no sangue 0,10 a 0,20% g e a atividade bactericida a partir de concentrações superiores a 0,3 g%. Nas concentrações inferiores a 0,06 g% o antisseptico pode ser considerado inactivo. Nas concentrações de 0,10 e 0,20g% não houve ação hemolitica, conservando o sangue o seu aspecto normal, principalmente no que se refere a colocação. A concentração de 0,1g% do antisseptico adicionado a solução ACD (Ácido Citrico, Citrato de Sódio, Dextrose) foi capaz de reduzir a zero a elevada letalidade observada nos grupos de camundongos inoculados com sangues contaminados sem antisseptico. Finalmente concluiu-se sobre as possibilidades do uso do ácido bórico adicionado a solução ACD na concentração final de 0,1 g% como antisseptico de sangue conservado. Conforme dados compulsados na literatura referente a intoxicação do homem pelo ácido bórico, verificou-se que as concentrações que poderiam ser adicionadas como antisseptico no sangue são possivelmente inferiores a dose tóxica, entretanto, recomenda-se que a aplicação do método seja precedida de estudos complementares.

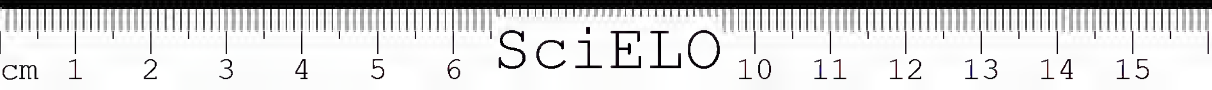
UNITERMOS — Contaminação bacteriana em Banco de Sangue. Ácido bórico como antisseptico de sangue conservado.

INTRODUÇÃO

Os acidentes transfusionais graves decorrentes do uso de sangue contaminado, registrados em todo o mundo, levaram a pesquisar a ação de antissépticos que, adicionados ao sangue ou ao plasma, possam atuar como bacteriostáticos sem alterar-lhe as suas características físicas, químicas e biológicas e sem provocar manifestações de intolerância no receptor de transfusão.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de doutor.

Endereço para correspondência:
C.P. 65, São Paulo, Brasil



O aspecto bacteriológico da contaminação em Banco de Sangue foi motivo de exaustivos estudos. Rivera Bandres (1967) no capítulo da etiologia dos acidentes por contaminação, estabeleceu a freqüência destas contaminações em 3 a 5%. Discombe e Meyer (1954) a encontraram em 3 a 5% dos casos; Braude e col. (1952), 2,24%; Stevens e col. (1953), 1 a 3%; Vonkilch (1967), 15%; Spooner (1967), 5%; Bagdasarov (1967), 3,9%, no Instituto de Leningrado, 1,1% no Serviço de Botkin e 2,8% nos pequenos serviços militares de transfusão, duranto a guerra; Whitby (1967) estimou em aproximadamente 5% nos Bancos de Sangue ingleses, durante os anos de 1939 e 1945; durante o mesmo período, Heath e Province (1942) encontraram 8,5% de contaminação bacteriana em 6151 plasmas colhidos na cidade de Nova Yorque.

Entre nós, Faria (1960), em 3000 frascos de plasmas examinados pela bacterioscopia direta pré-transfusional, encontrou 3,3% de frascos suspeitos; Soerensen (1965), em 2194 sangues examinados, encontrou 1% de contaminados.

Acidentes transfusionais mortais e reações pirogênicas foram relatadas em nosso meio por Faria (1957, 1958, 1960), Santos Freire (1965) e Soerensen e col. (1965). Fora do Brasil, entre outros: Leiva Cofré (1944), Borden e Hall (1951), Stevens e col. (1953), Braude e col. (1953), Mc Entegrat (1956), André e col. (1959), Germain e col. (1959), Massé e col. (1959) e Sanchez Mendal e col. (1961).

A mortalidade decorrente da transfusão de sangue contaminado é de aproximdamente 60%, Schier (1968), ou ainda de 50 a 90%, Miecznikowski e Kus (1966).

Os estudos realizados por Pittman (1963) demonstram que os germes que proliferam em sangue refrigerado devem apresentar as características seguintes: utilização de nutrientes do sangue, resistência à ação letal e capacidade de multiplicação imediata a baixa temperatura. Através deste trabalho, podemos ter idéia do perigo de contaminação ante a ausência de atividade bacteriostática do sangue sobre numerosos germes. Efetivamente, conforme estudos referidos por Blatrix e col. (1963), a conservação do sangue a +4° inibe a fagocitose e diminui o poder bactericida do sangue, reduzindo a autoesterilização; paralelamente, Grimberg e col. (1936) demonstraram a inibição da ação bactericida do sangue exercida pelo citrato de sódio, quando usado em concentrações elevadas sobre cepas de Coliformes e bacilos tíficos.

Diversos germes foram isolados de sangue e produtos derivados: *Achromobacter*, Bordem e Hall (1951); *Paracolobactrum aerogenoides*, Bordem e Hall (1951), Faria (1960); *Aerobacter aerogenes*, Braude e col. (1952); *Paracolobactrum intermedium*, Pittman (1953); *Escherichia freudii*, Pittman (1953); *Coliforme*, Braude e col. (1955); *Pseudomonas sp*, Braude e col. (1955), Soerensen e col. (1965); *Alcaligenes faecalis*, Faria (1957); *Flavobacterium*, Boy e col. (1958), *M. pyogenes, var. albus*, Faria (1960); *Klebsiella*, Faria (1960); *S. salivarius*, *Faria* (1960); levedura, Faria (1960); *B. subtilis*, isolado de um partida de solução A.C.D. contaminada, Faria (1960); *Aerobacter liquefaciens*, Sanchez Mendal e col. (1961); *Staphylococcus* coa-

gulase negativa, Soerensen e col. (1965); bacilos Gram positivos, Soerensen e col. (1965).

Os germes contaminantes de sangue são, na sua maioria, psicrofílos, Faria (1967), Soerensen e col. (1965).

Estas contaminações podem ter a sua origem nas bacteremias não patológicas do doador de sangue, como a processada no período pós-prandial, na esterilização deficiente dos frascos de solução conservadora de sangue, nas do aparelho de colheita, a assepsia deficiente da pele do braço do doador e qualquer falha do sistema fechado, tanto de extração como nas referentes às manipulações posteriores do frasco de sangue.

Os centros de colheita de sangue, que não apresentam condições que assegurem a esterilidade do material e a assepsia necessária na manipulação do sangue, fazem aumentar consideravelmente a incidência de contaminação. A falta de refrigeração apropriada do sangue para a conservação e o transporte, acelera a multiplicação bacteriana, transformando os frascos de sangue em verdadeiros caldos de cultura de germes, Soerensen e Sampaio Correa (1965). Nos Bancos de Sangue, mesmo aqueles considerados de bom padrão, existe um risco de contaminação bacteriana acidental.

Paralelamente, foi relatado por Munzer e col. (1963) que a contaminação do tubo piloto de sangue pode dar eventualmente reações de Coombs falso-positivos.

O aspecto clínico do choque transfusional também foi objeto de estudos. As manifestações clínicas observadas pela introdução de grande número de bactérias através do sangue ou do plasma, decorrem da ação de endotoxinas, Geller e col. (1954), e consistem em: tremores, febre (geralmente dentro de uma hora após o início da transfusão), náuseas, rápida queda de pressão sangüínea com colapso vascular periférico, hemorragia, anúria e, de modo geral, morte num período de 30 horas, Soerensen e col. (1965). Diante deste quadro clínico, o diagnóstico laboratorial deve ser feito através de exame bacteriológico imediato do resíduo de sangue contido no frasco usado na transfusão.

É possível que as reações pirogênicas observadas freqüentemente, sejam devidas, em grande parte, à veiculação de pequeno número de bactérias; sabe-se que apenas os sangues altamente contaminados são mortais, daí a freqüência relativamente baixa dos casos fatais.

Quanto aos métodos usados para evitar a transfusão de sangue contaminado, pode-se dizer que, indubitavelmente, devem-se prevenir as contaminações pelo controle rigoroso da esterilização dos frascos e aparelhos de coleta, pela assepsia rigorosa no momento da coleta e ulterior fracionamento do sangue, e, finalmente, pela conservação dos frascos de sangue a baixa temperatura em geladeira (a temperatura ótima de crescimento da grande maioria dos germes que interessam a Bancos de Sangue é aproximadamente 25°), Soerensen e Sampaio Correa (1965). Ainda no capítulo de métodos profiláticos, Rivera Bandres (1956) recomenda boa esterilização cutânea, a fim de proceder a punção venosa e evitar a colheita em doadores que ingeriram alimentos durante as

últimas 3 horas. Complementarmente, recomenda aos doadores habituais que evitem escovar os dentes instantes antes da doação, e, finalmente, evitar a colheita de sangue diante da menor suspeita de processo bacteriano, como pequenos furúnculos, piodermites ligeiras, focos dentários, etc.

Acreditamos que as técnicas modernas de colheita e conservação do sangue e plasma em saco plástico tenham contribuído para a diminuição da contaminação.

Conforme observações de James e Stokes (1957), a simples conservação do sangue a 37° pelo período de duas horas imediatamente após a colheita, diminui a contaminação bacteriana.

O método da bacterioscopia pré-transfusional é o mais adequado para evitar o uso de sangue ou de plasma contaminados. A bacterioscopia pré-transfusional em microscopia de fase foi aconselhada na Alemanha por Discombe e Meyer (1954) e entre nós por Faria (1960). Petselt (1963), na Alemanha, recomenda que a bacterioscopia pré-transfusional seja feita em lâmina corada pelo azul de metileno ou pelo método de Gram. Entre nós, ainda, Soerensen (1965) preconizou nova técnica para a execução da bacterioscopia pré-transfusional em lâmina corada pelo azul de metileno, demonstrando as várias vantagens que a técnica oferece.

Recentemente, Soerensen e col. (1972) preconizaram novo método para a determinação da contaminação bacteriana através da dosagem de glicose com tira reagente. Este método é aconselhado quando não existe a possibilidade de exame microscópico.

Conforme nossas observações, é imprescindível que os sangues sejam submetidos a bacterioscopia pré-transfusional, pois a observação macroscópica do sangue contaminado não apresenta, de maneira geral, nenhuma alteração que indique o perigo de sua aplicação.

Independentemente dos aspectos que foram estudados, merece atenção especial o uso de antissépticos em sangue e plasma estocados; numerosos autores estudaram a solução do problema das contaminações através do uso de bacteriostáticos adicionados ao plasma ou ao sangue integral.

A ação bacteriostática da acridina e do trifenilmetano foi originalmente estudada no plasma por Churchman (1939) e a ação do Mertiolato ®, por Jamienson e Powell (1939). Estes resultados, entretanto, conforme Novak (1939b), não foram satisfatórios.

Novak, em 1939 (a), introduziu o uso da sulfanilamida na preservação do sangue. No mesmo ano, Harrington e Miles (1939) também o recomendam na Inglaterra. Estes resultados são confirmados por Hunwicke, em 1940; ainda no mesmo ano, Bécart e Philippe (1940) estudam as sulfamidas na preservação do plasma. Em 1942, Novak aborda novamente o assunto, analisando os resultados obtidos durante 2 anos de uso das sulfamidas, recomendando, muito especialmente, a adição do sulfatiazol para a preservação do plasma.

Em 1942, Heath e Province, numa análise crítica sobre o uso de antissépticos no plasma, referindo-se às sulfamidas, chama a atenção para o efeito apenas bacteriostático sobre alguns germes, sendo praticamente ineficaz sobre a *Pseudomonas aeruginosa*, germe este freqüente como contaminante de sangue.

Paralelamente aos trabalhos realizados com sulfamidas na preservação do sangue, foram usados diversos antissépticos, como o azul de metileno, em 1940, Spivak e Pelishenko. Em 1941, Macky estuda o efeito bacteriostático de antissépticos no soro humano e plasma citratado, constatando que Mertiolato ®, Metaphen ® nitrato de fenilmercúrio e proflavina mostram ação inibitória por espaço relativamente curto sobre *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *M. tetragenes*, *Enterococcus*. O referido autor ressalta, ainda, que nenhum dos antissépticos usados apresentou ação inibitória sobre a *Pseudomonas pyocianea*, e a impossibilidade do uso em concentrações maiores, devido a sua toxidez; ressalta ainda, que os testes realizados com timol e p-cloro-m-cresol foram ineficientes como bacteriostáticos e quanto ao fenilmercúrio, o inconveniente da precipitação das proteinas do soro.

Em 1943, Milzer, referindo-se ao assunto, afirma que infelizmente não se conhece um antisséptico adequado, que assegure a esterilidade do plasma. Efetivamente, os estudos de Smith e col., realizados já em 1936, demonstraram que proteínas do soro neutralizam rapidamente o efeito bactericida do Mertiolato ® e de outros preservativos mercuriais.

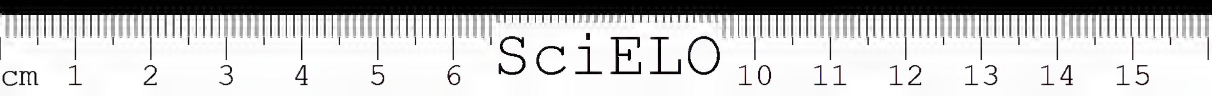
Em 1959, Mathes, após revisão do assunto, refere que até o momento foram usados, como antissépticos do plasma ou do sangue, entre outros, Neosalvarsan ®, Urotropina sulfanilamida, azul de metileno, Prontosil ®, Nipagin ®, sulfapiridina, fenol, Rivanol ® associado a tripaflavina, sulfatiazol, Albucid sódico ®, timol, penicilina associada a sulfonamida. sulfapiridina associada a Rivanol ® e cloranfenicol.

Este mesmo autor analisa os resultados, conclue que os correspondentes a sulfonamidas e antissépticos foram pouco satisfatórios, destacando-se úteis, somente alguns antibióticos. como o cloranfenicol e a tetraciclina, merecendo destaque o primeiro. Os sinonimos e fórmula química das substâncias citadas encontram-se no Anexo I.

Na Rússia, onde é usado o sangue de cadáver para transfusão, Shamov (1937), Yudin (1937), pode-se observar que são muito empregadas as sulfonamidas, a penicilina e outros antibióticos. Mesmo assim, os hemoterapeutas russos acham que a adição de antissépticos é completamente secundária, sendo muito mais importante a aplicação de normas técnicas de extração e conservação. Quando for usado sangue de placenta para transfusão, como descrito por Page e col. (1939), igualmente as possibilidades de contaminação são maiores, devido a manipulação. Nos casos necessários, Bagdasarov (1967) recomenda sulfatiazol.

Até o presente momento não foi encontrado um antisséptico que reuna todas as condições indispensáveis para a sua aplicação. Todos os autores preocuparam-se em testar os diferentes antissépticos de maneira geral, apenas diante de germes patogênicos, esquecendo que estes, geralmente, não possuem a capacidade de multiplicação a baixa temperatura, fato confirmado pelo isolamento de numerosas bactérias saprófitas de sangue contaminado.

As normas estipuladas pelo U.S. Department of Health Education and Welfare não permitem o uso de antisséptico no plasma, recomendando a manipulação asséptica e sua esterilização através de radiação ultravioleta.



O uso de antibióticos, a nosso ver, não seria recomendável, uma vez que exige sejam adicionados posteriormente à colheita do sangue, a fim de evitar a perda de atividade na esterilização pelo calor ou ainda durante a estocagem dos frascos de solução conservadora.

Evidentemente, se for necessário o uso de antisséptico, este deverá estar contido na solução conservadora e deverá apresentar, ainda, a característica da impossibilidade de alteração através do tempo, em condições diversas de estocagem. Paralelamente, são requisitos fundamentais: 1) que possua ação bacteriostática sobre a maioria dos germes contaminantes de sangue; 2) que não altere as características dos diferentes componentes do sangue e 3) que nas doses usadas não exerça ação tóxica sobre o organismo do receptor, inclusive sendo praticada transfusão de grandes volumes de sangue.

Desde 1965 nos interessamos pelo assunto e sentimos de perto os problemas que são enfrentados para impedir a contaminação do sangue, evitar a transfusão de sangue contaminado ou ainda a mortalidade elevada decorrente da transfusão de sangue e plasma contaminados.

Diante do insucesso no uso de todos os antissépticos e antibióticos ensaiados até a presente data, nos propuzemos estudar o ácido bórico como antisséptico de sangue conservado.

O ácido bórico foi escolhido devido a sua reconhecida ação antibacteriana. Após exaustiva pesquisa na literatura não encontramos relato sobre o uso de ácido bórico como antisséptico de sangue conservado.

É objetivo do presente Trabalho demonstrar que em concentrações inócuas conserva a sua ação antibacteriana.

MATERIAL E MÉTODOS

As cepas usadas no presente trabalho foram isoladas por nós no período compreendido entre os anos de 1965 e 1966, em 26 frascos de sangue maciçamente contaminados, dos quais 3 responsáveis por acidentes transfusionais mortais. As cepas, todas psicrófilas, são 12 do gênero *Pseudomonas*, 8 do gênero *Enterobacter* e 6 do gênero *Bacillus*, sendo conservadas em ampolas liofilizadas.

A identificação das 24 cepas foi feita pelos Drs. Margaret Pittman e Charles R. Manclark, do National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A., e as cepas correspondentes aos números 1919 e 3192 foram identificadas por Soerensen e col. (1965). Os números correspondem a identificação do sangue doador.

Não incluimos deliberadamente, no presente trabalho, um *Staphylococcus albus* com prova de coagulase negativa, por não possuir a capacidade de multiplicação em geladeira 4-6° (Soerensen e col., 1965).

Na Tabela I (p. 13) encontra-se a identificação das cepas usadas.

Inicialmente, ocupamo-nos em investigar a ação antibacteriana do ácido bórico sobre as cepas acima mencionadas.

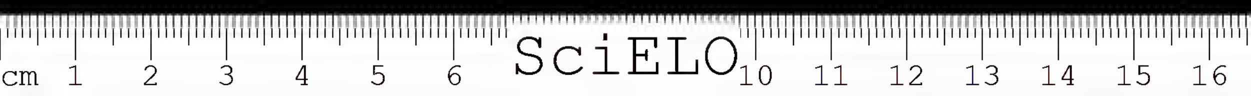


TABELA I

Identificação das 26 cepas psicrófilas isoladas de sangue conservado.

Identificação da cepa	Gênero	Espécie
1919 3192	*PSEUDOMONAS*	Não identificada.
0010 4436 6504	*PSEUDOMONAS*	Não correspondendo às características de *P. aeruginosa; P. fluorescens; P. putida; P. multivorans; P. maltophilia* e *P. pseudomallei.*
6679 6785 7076 7583 33960	*PSEUDOMONAS*	Similar, mas não idêntica a *P. stutzeri.*
1910	*PSEUDOMONAS*	*multivorans.*
3863	*PSEUDOMONAS*	*fluorescens.*
1323 1530 1533 6892 7860	*ENTEROBACTER*	*liquefaciens.*
4011 4979 7582	*ENTEROBACTER*	*aerogenes.*
1044 9223 9437 33992 BSH 3454	*BACILLUS*	Não identificada.

1. *Atividade antibacteriana do ácido bórico em plasma humano conservado a 4-6º e contaminado propositalmente.*

Para a determinação da ação antibacteriana do ácido bórico foi obedecida a técnica usada por McKay (1941) em estudos de atividade antibacteriana de diversos antissépticos em plasma sanguíneo.

O teste foi realizado com plasma humano separado assepticamente por centrifugação de sangue colhido em solução A.C.D. (Ácido cítrico, citrato de sódio, dextrose).

Foi distribuido em 26 séries de 7 tubos fechados com rolhas de borracha, contendo os primeiros tubos 9 ml e os demais 5 ml.

Aos primeiros tubos de cada série foi adicionado 0,1 g de ácido bórico contido em 1 ml de solução aquosa.

A partir destes tubos, foram feitas diluições ao dobro, em tubos contendo 5 ml de plasma, obtendo-se as seguintes diluições: 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 e 1/3200, que correspondem respectivamente às seguintes concentrações: 1,00; 0,50; 0,25; 0,12; 0,06 e 0,03 g%. O sétimo tubo de cada série permaneceu como controle (sem ácido bórico). A cada série de tubos destinados a uma determinada cepa foi adicionado, com pipeta, 0,2 ml de uma suspensão, contendo 100 a 1000 microrganismos. A concentração bacteriana foi determinada previamente por opacidade e através de tentativas foi estabelecida a concentração em número de germes por contagem em placa.

Os tubos foram conservados em geladeira a 4-6° pelo período de 20 dias, período este recomendado como máximo para o uso de sangue integral para transfusão. Completado este período foi retirado de cada tubo, após ligeira agitação, uma amostra de plasma a fim de submeter a cultura em placas de agar simples.

As culturas foram realizadas depositando 1 ml do conteúdo de cada tubo (20 a 200 bactérias) em 3 placas de Petri de 13 cm de diâmetro, esterilizadas, colocando-se a seguir em cada placa 10 ml de agar simples fundido (45°) misturada por delicada agitação circular e logo após solidificação, incubados pelo período de 72 horas a 25°, determinando-se a média aritmética das colonias encontradas.

2. *Influência das diferentes concentrações de ácido bórico na preservação de hemácias humanas conservadas a 4-6°*

Uma vez conhecida, diante das condições de nosso teste, a menor concentração de ácido bórico que exerce ação bacteriostática, investigamos o grau de hemólise de diversas concentrações do antisséptico. Por motivo de ordem prática, iniciamos pela concentração de 0,1g% e incluimos concentrações superiores 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6g% a fim de sentirmos melhor a influência que poderia exercer.

Trabalhamos com 3 amostras de sangue provenientes de 3 doadores. Estes sangues foram colhidos em solução A.C.D. e a seguir pipetados asseptieamente no volume de 10 ml em 14 tubos esterilizados de 18x180 mm com tampa de borracha contendo diferentes concentrações de ácido bórico em 0,5 ml de solução aquosa.

Dois tubos para cada amostra foram destinados a cada concentração de ácido bórico, incluindo 2 tubos controle sem ácido bórico. Os mesmos foram mantidos pelo período de 20 dias em geladeira (4-6°) e a intervalos de 5 dias eram observados, sendo que um dos sangues correspondente a cada concentração do antisséptico permanecia em repouso e o outro submetido a ligeira agitação circular.

Após 20 dias de observação todos os sangues foram centrifugados a 2000 r.p.m. durante 10 minutos a fim de avaliar o grau de hemólise através da dosagem de hemoglobina. Para esta dosagem foi usado o método de Karr-



Chorncek modificado e recomendado para esse fim pelo National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (1952). Conforme normas estipuladas por essa Instituição o plasma não deverá conter mais que 25 mg de hemoglobina por 100ml, portanto admitimos esta cifra como máxima a ser tolerada.

3. *Atividade antibacteriana do ácido bórico em sangue humano conservado a 4-6° e contaminado propositalmente.*

Após verificação da ausência de ação hemolítica do ácido bórico nas concentrações de 0,1 g%, concentração esta praticamente correspondente a ação bacteriostática sobre as cepas por nós estudadas, pesquisamos a atividade bacteriostática em sangue estocado a 4-6°.

O experimento foi conduzido da seguinte maneira: a colheita do sangue foi feita em separado, em frascos contendo solução A.C.D. e ácido bórico nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6g%. Estes frascos foram esterilizados por autoclavação a 110° durante 30 minutos. Foi incluida para cada cepa contaminante uma amostra de sangue controle, sem antisséptico.

Visando o posterior estudo da atividade tóxica do sangue contaminado, usamos 12 ml de sangue por tubo correspondente a cada cepa assim como a cada concentração de ácido bórico; isto nos obrigou a colheita de sangue de vários doadores.

No dia da colheita procedemos a contaminação proposital dos sangues contendo diversas concentrações do antisséptico, incluindo-se sempre para cada cepa uma amostra de sangue controle sem ácido bórico, desta maneira cada uma das 26 cepas serviu para contaminar uma série de tubos contendo diferentes concentrações do antisséptico e ainda um tubo controle, sem antisséptico.

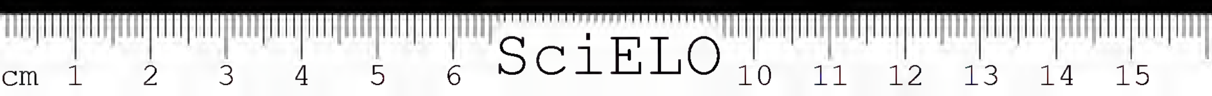
A contaminação dos tubos de sangue foi procedida de maneira idêntica àquela da determinação da atividade antibacteriana do ácido bórico em plasma citratado; o período de observação foi também de 20 dias em geladeira (4-6°).

Independentemente da contagem de germes em placa procedemos a bacterioscopia pelo método de Gram, de cada amostra de sangue.

4. *Atividade tóxica de amostras de sangue contaminado contendo como antisséptico ácido bórico.*

Após a verificação da atividade bacteriostática do ácido bórico na concentração de 0,1g% em sangue total, nos interessamos em pesquisar a atividade tóxica destas amostras de sangue contaminado, através de inoculação em camundongo.

Com esse objetivo, utilizamos o método descrito por Geller e col. (1954). Este método consiste na inoculação de 0,5 ml de sangue por via intraperitoneal em camundongo de 12 a 18g.



Foram usadas nas inoculações as amostras de sangue contaminado correspondentes a concentração de 0,1g% de antisséptico assim como as correspondentes a sangue contaminado sem antisséptico. Estas amostras foram as mesmas que serviram na determinação da atividade bacteriostática do ácido bórico em sangue.

Nos testes foram usados 848 camundongos swiss, machos de 12 a 18 g. divididos da seguinte maneira: 416 animais em 26 grupos de 16 camundongos para cada amostra de sangue contaminado contendo ácido bórico na concentração de 0,1g%. Número igual de animais foi utilizado com as amostras de sangue contaminado sem antisséptico.

Um grupo de 16 camundongos foi inoculado com sangue não contaminado.

Todos os animais receberam o mesmo tratamento e após 48 horas foi determinada a letalidade para cada sangue contaminado contendo antisséptico assim como para os grupos correspondentes de animais inoculados com sangue sem antisséptico.

RESULTADOS

1. *Atividade antibacteriana do ácido bórico em plasma humano conservado a 4-6º e contaminado propositalmente.*

Através da análise da Tabela II (p. 27), pode-se observar que:

1.1. O ácido bórico exerceu atividade possivelmente bactericida a partir das concentrações superiores a 0,500 g% sobre todas as cepas submetidas ao teste.

1.2. Nas concentrações de 0,12 a 0,25 g% exerceu ação bacteriostática.

1.3. Nas concentrações inferiores a 0,06 g% pode ser considerado inativo.

2. *Influência das diferentes concentrações de ácido bórico na preservação de hemácias humanas conservadas a 4-6º.*

Pode-se observar através do exame da Tabela III (p. 28), que:

2.1. O ácido bórico nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3 g% não exerceu ação hemolítica sobre nenhuma das amostras de sangue empregadas quando as mesmas foram mantidas em repouso. Entretanto, quando submetidas a agitação periódica, na última concentração, a dosagem de hemoglobina ultrapassou 25 mg%. Independentemente, foi possível seguir com intervalos de 5 dias a progressão da hemólise nos tubos de sangue contendo antisséptico e sangue controle Fig. 1, 2, 3 e 4 (p. 29).

2.2. O ácido bórico nas diferentes concentrações não modificou o aspecto normal do sangue, principalmente no referente a coloração Fig. 5 (p. 29).



TABELA II

Ação antibacteriana do ácido bórico em plasma humano conservado a 4°6C.

Cepa	Genero	Espécie	NÚMERO DE COLONIAS — CONCENTRAÇÃO DO DESINFETANTE 1,000 g%	0,500 g%	0,250 g%	0,125 g%	0,062 g%	0,031 g%	Controle (sem desinfetante)
1919	*PSEUDOMONAS*	Não identificada	0	0	91	23	incont.	incont.	incont.
3192			0	0	40	38	incont.	incont.	incont.
0010		Não correspondendo às características do *P. aeruginosa; P. fluorescens; P. putida; P. stutzeri; P. multivorans; P. maltophilia* e *P. pseudomallei.*	0	0	0	81	incont.	incont.	incont.
4436			0	0	0	19	incont.	incont.	incont.
6504			0	0	60	57	incont.	incont.	incont.
6679		Similar, mas não idêntica a *P. stuzeri*	0	0	12	19	incont.	incont.	incont.
6785			0	0	31	14	incont.	incont.	incont.
7076			0	0	43	98	incont.	incont.	incont.
7583			0	0	29	30	incont.	incont.	incont.
33960			0	0	29	30	incont.	incont.	incont.
1910		*multivorans*	0	0	23	9	incont.	incont.	incont.
3863		*fluorescens*	0	0	28	17	incont.	incont.	incont.
1323	*ENTEROBACTER*	*liquefaciens*	0	0	9	14	incont.	incont.	incont.
1530			0	0	20	15	incont.	incont.	incont.
1533			0	0	44	39	incont.	incont.	incont.
6892			0	0	12	41	incont.	incont.	incont.
7860			0	0	7	4	incont.	incont.	incont.
4011		*aerogenes*	0	0	30	90	incont.	incont.	incont.
4979			0	0	31	18	incont.	incont.	incont.
7582			0	0	81	77	incont.	incont.	incont.
1044	*BACILLUS*	Não identificada	0	0	62	91	incont.	incont.	incont.
9223			0	0	11	16	incont.	incont.	incont.
9437			0	0	30	32	incont.	incont.	incont.
33992			0	0	15	14	incont.	incont.	incont.
BSH			0	0	11	8	incont.	incont.	incont.
3454			0	0	24	31	incont.	incont.	incont.

0 = cultura negativa.
incont. = incontáveis.

TABELA III

Dosagem de hemoglobina no plasma (método do Karr-Chornock modificado pelo National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) de sangue colhido com diferentes concentrações de ácido bórico.

Sangue	CONTROLE													
	Repouso	Agitação periódica	0,1 g% Repouso	0,1 g% Agitação periódica	0,2 g% Repouso	0,2 g% Agitação periódica	0,3 g% Repouso	0,3 g% Agitação periódica	0,4 g% Repouso	0,4 g% Agitação periódica	0,5 g% Repouso	0,5 g% Agitação periódica	0,6 g% Repouso	0,6 g% Agitação periódica
A	5 mg%	22 mg%	5 mg%	9 mg%	9 mg%	16 mg%	7 mg%	30 mg%	13 mg%	39 mg%	15 mg%	48 mg%	30 mg%	60 mg%
B	7 mg%	20 mg%	9 mg%	15 mg%	9 mg%	20 mg%	4 mg%	28 mg%	13 mg%	35 mg%	13 mg%	50mg%	33 mg%	61 mg%
C	7 mg%	24 mg%	5 mg%	18 mg%	7 mg%	20 mg%	5 mg%	33 mg%	16 mg%	35 mg%	18 mg%	43 mg%	28 mg%	58 mg%

SOERENSEN, B. — Contribuição para o estudo do ácido bórico como antisséptico de sangue conservado.
Mem. Inst. Butantan, 37: 17-42, 1973.



Fig. 1

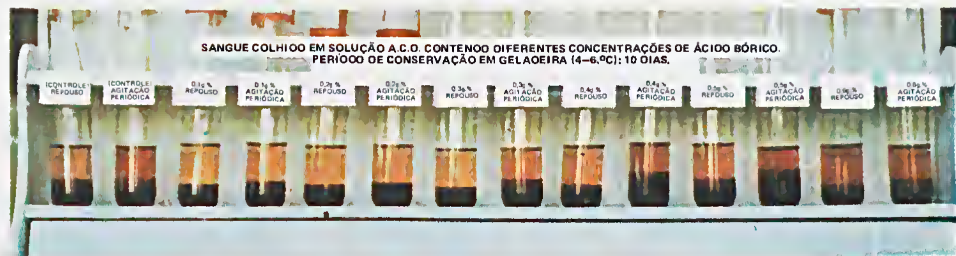


Fig. 2



Fig. 3

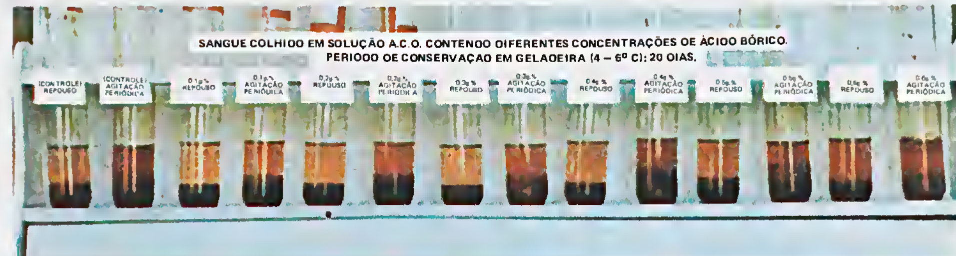


Fig. 4

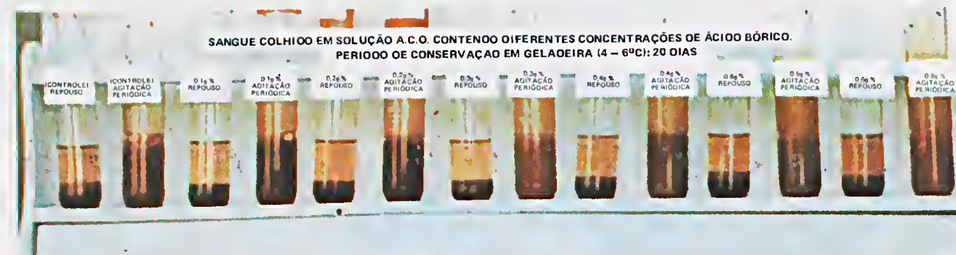


Fig. 5

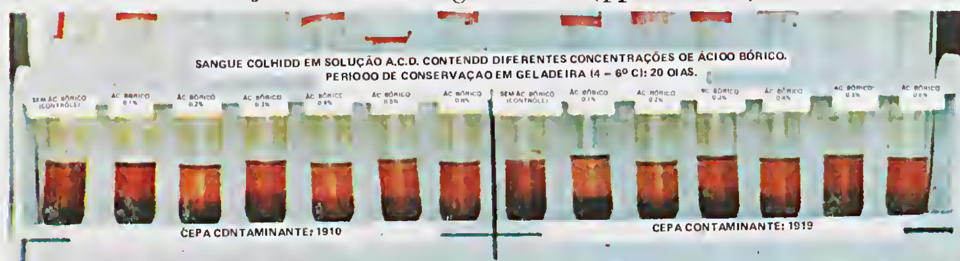
3. *Atividade antibacteriana do ácido bórico em sangue humano conservado a 4-6º e contaminado propositalmente.*

3.1. A bacterioscopia direta das amostras de sangue contendo ácido bórico nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 g% resultaram negativas, entretanto as realizadas com amostras sem antisséptico (controle) resultaram positivas, confirmando as características morfológicas e tintoriais correspondentes a cepa contaminante.

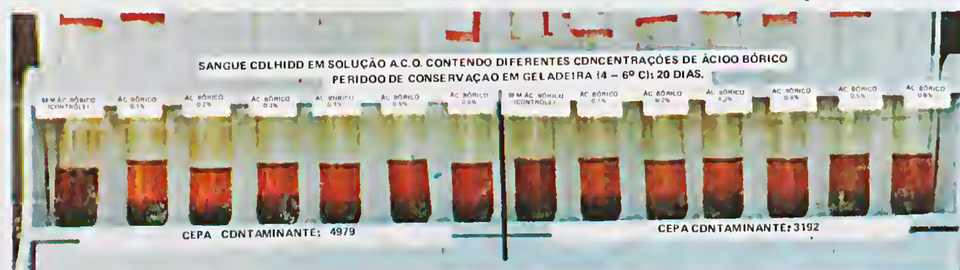
3.2. As concentrações de 0,1 e 0,2 g% de ácido bórico exerceram atividade bacteriostática — Tabela IV (p. 33).

3.3. A partir da concentração de 0,2 g% exercem possivelmente atividade bactericida.

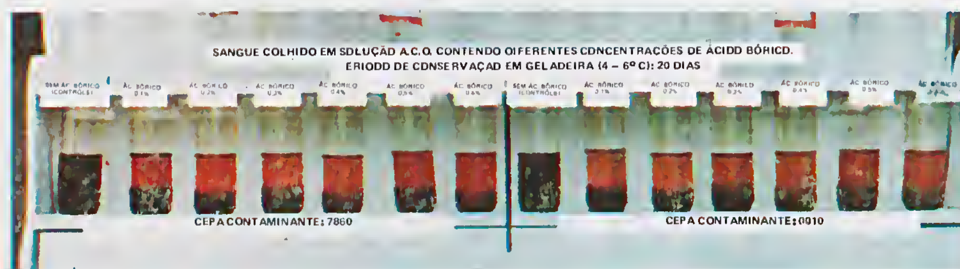
3.4. As amostras de sangue correspondentes às concentrações de 0,1 e 0,2 g% de antisséptico apresentaram-se com as características físicas de sangue normal. Isto não aconteceu com as das amostras controles (sem antisséptico) onde dependendo das características da cepa contaminante, eram nítidas as alterações de cor para vermelho-escura, violácea ou ainda a verificação de evidente grau de hemólise ou presença de fibrina. Figs. 6 a 18 (pp. 30 a 32).



P. multivorans Fig. 6 *Pseudomonas Sp.*



E. aerógenes Fig. 7 *Pseudomonas Sp.*



E. liquefaciens Fig. 8 *Pseudomonas Sp.*

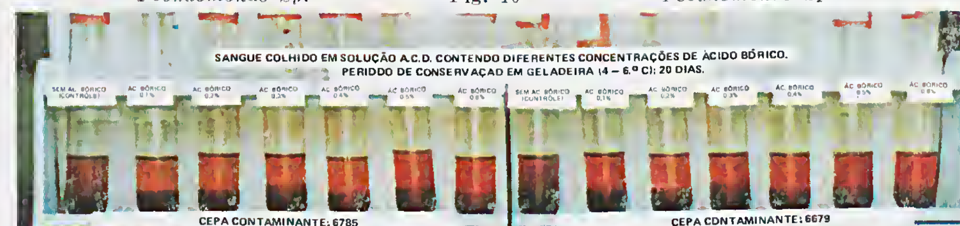
SOERENSEN, B. — Contribuição para o estudo do ácido bórico como antisséptico de sangue conservado.
Mem. Inst. Butantan, *37*: 17-42, 1973.



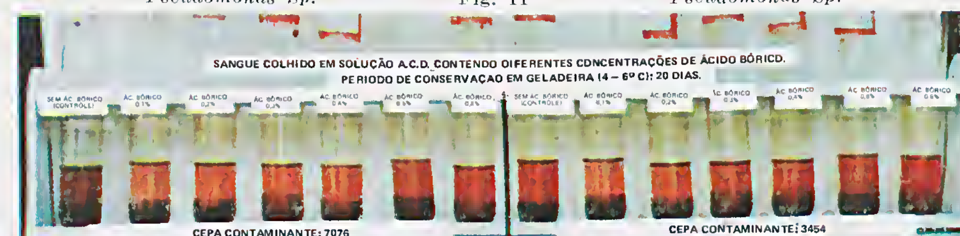
Pseudomonas Sp. Fig. 9 *Pseudomonas Sp.*



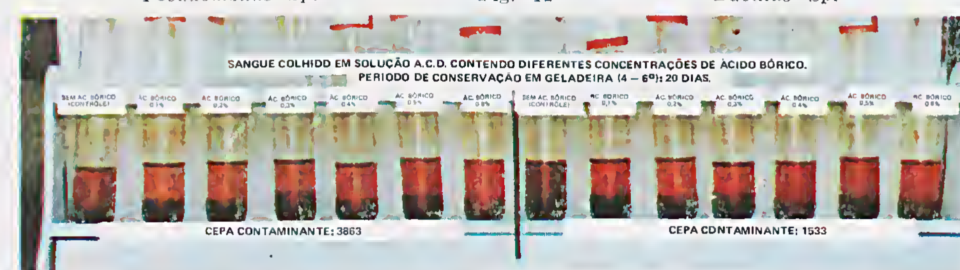
Pseudomonas Sp. Fig. 10 *Pseudomonas Sp.*



Pseudomonas Sp. Fig. 11 *Pseudomonas Sp.*

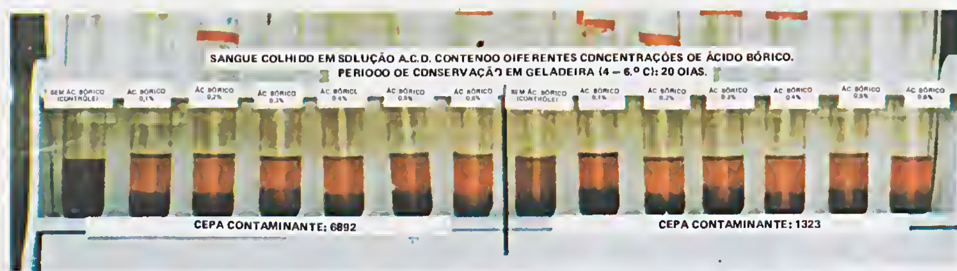


Pseudomonas Sp. Fig. 12 *Bacillus Sp.*

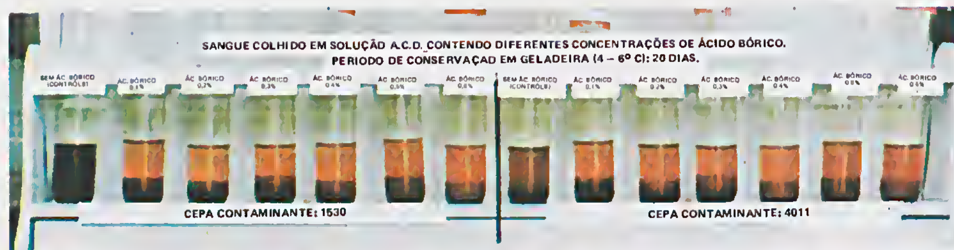


P. fluorescens Fig. 13 *E. liquefaciens*

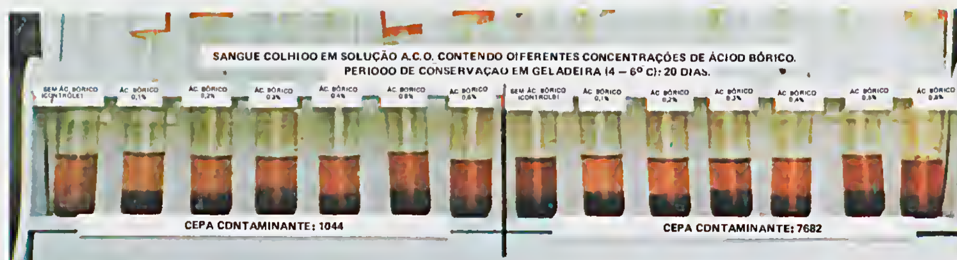
SOERENSEN, B. — Contribuição para o estudo do ácido bórico como antisséptico de sangue conservado.
Mem. Inst. Butantan, 37: 17-42. 1973.



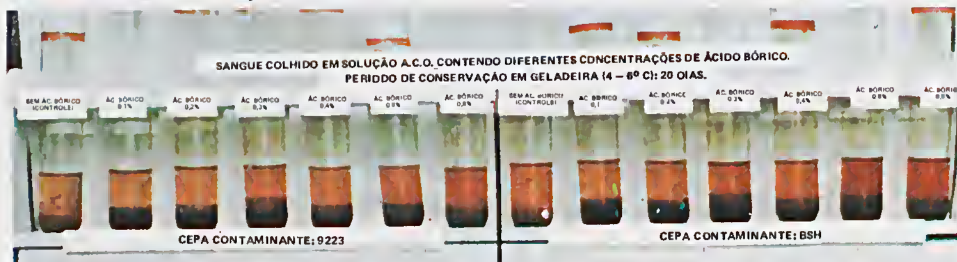
E. liquefaciens Fig. 14 *E. liquefaciens*



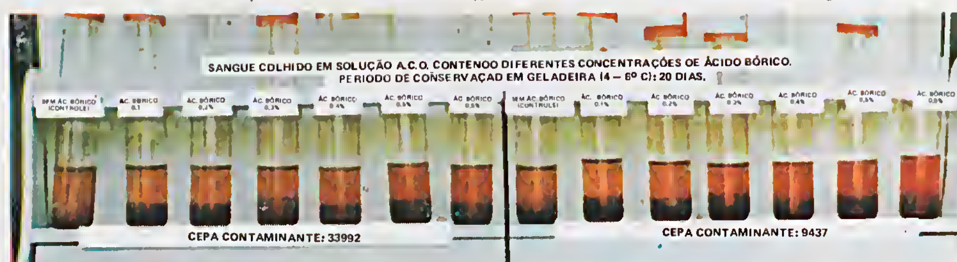
E. liquefaciens Fig. 15 *E. aerogenes*



Bacillus Sp. Fig. 16 *E. aerogenes*



Bacillus Sp. Fig. 17 *Bacillus Sp.*



Bacillus Sp. Fig. 18 *Bacillus Sp.*

Atividade bacteriostática do ácido bórico em sangue conservado a 4-6°C

Cepa contaminante do sangue	Genero	Espécie	NÚMERO DE COLONIAS						
			Controle (sem desinfetante)	Concentração do desinfetante					
				0,1 g%	0,2 g%	0,3 g%	0,4 g%	0,5 g%	0,6 g%
1919	*PSEUDOMONAS*	Não identificada.	incont.	18	6	0	0	0	0
3192			incont.	40	51	0	0	0	0
0010		Não correspondendo às caracteristicas de *P. aeroginosa; P. fluorescens;; P. putida; P. stutzeri; P. multivorans; P. maltophilia* e *P. pseudomallei.*	incont.	47	23	0	0	0	0
4436			incont.	12	49	0	0	0	0
6504			incont.	16	16	0	0	0	0
6679		Similar, mas não idêntica a *P. stutzeri.*	incont.	4	17	0	0	0	0
6785			incont.	17	15	0	0	0	0
7076			incont.	33	30	0	0	0	0
7583			incont.	91	86	0	0	0	0
33960			incont.	70	52	0	0	0	0
1910		*multivorans.*	incont.	19	28	0	0	0	0
3863		*fluorescens.*	incont.	5	31	0	0	0	0
1323	*ENTEROBACTER*	*liquefaciens.*	incont.	29	90	0	0	0	0
1530			incont.	78	70	0	0	0	0
1533			incont.	19	9	0	0	0	0
6892			incont.	83	52	0	0	0	0
7860			incont.	17	20				
4011		*aerogenes.*	incont.	31	48	0	0	0	0
4979			incont.	69	48	0	0	0	0
7582			incont.	37	60	0	0	0	0
1044	*BACILLUS*	Não identificada.	incont.	19	32	0	0	0	0
9223			incont.	21	13	0	0	0	0
9437			incont.	19	40	0	0	0	0
33992			incont.	28	17	0	0	0	0
BSH			incont.	93	57	0	0	0	0
3454			incont.	44	71	0	0	0	0

As bacterioscopias feitas pelo método de Gram dos sangues controles (sem ácido bórico) resultaram positivas e os germes observados apresentaram-se com as características morfológicas e tintoriais das do inóculo. As correspondentes aos sangues colhidos com as diferentes concentrações do desinfectante foram todas negativas.

TABELA V

Atividade tóxica de amostras de sangue propositalmente contaminadas.

	Cepa contaminante do sangue	Letalidade %	
		Sangue colhido com antisséptico	Sangue colhido sem antisséptico
PSEUDOMONAS	1919	0,0	93,7
	3192	0,0	93,7
	0010 (1)	0,0	100,0
	4436 (1)	0,0	100,0
	6504 (1)	0,0	100,0
	6679 (2)	0,0	75,0
	6785 (2)	0,0	56,2
	7076 (2)	0,0	93,7
	7583 (2)	0,0	100,0
	33960 (2)	0,0	100,0
	1910 (3)	0,0	68,7
	3863 (4)	0,0	93,7
ENTEROBACTER	1323 (5)	0,0	93,7
	1530 (5)	0,0	100,0
	1533 (5)	0,0	100,0
	6892 (5)	0,0	100,0
	7860 (5)	0,0	100,0
	4011 (6)	0,0	87,5
	4979 (6)	0,0	100,0
	7582 (6)	0,0	81,2
BACILLUS	1044	0,0	31,2
	9223	0,0	12,5
	9437	0,0	43,7
	33992	0,0	81.2
	BSH	0,0	31,2
	3454	0,0	50,0

Um grupo de 16 camundongos foi inoculado com sangue não contaminado não tendo sido observada nenhuma morte num período de 48 horas.

(1) *Pseudomonas Sp.* não correspondendo às características de *P. aeruginosa; P. fluorescens; P. putida; P. stutzeri; P. multivorans; P. maltophilia; P. pseudomallei.*

(2) *Pseudomonas Sp.* similar, mas não idêntica a *P. stutzeri.*

(3) *Pseudomonas multivorans.*

(4) *Pseudomonas fluorescens.*

(5) *Enterobacter liquefaciens.*

(6) *Enterobacter aerogenes.*

4. *Atividade tóxica de amostras de sangue contaminado; contendo ácido bórico como antisséptico.*

Através da análise da Tabela V (p. 34) podemos chegar aos seguintes resultados:

4.1. No grupo de animais que recebeu sangue colhido com antisséptico e posteriormente contaminado não foi verificada nenhuma morte.

4.2. No grupo de animais que recebeu sangue colhido sem antisséptico e posteriormente contaminado, foi verificada uma elevada letalidade, com especial destaque aos correspondentes às cepas *Pseudomonas* e *Enterobacter*.

4.3. No grupo de 16 animais que recebeu apenas sangue normal (não contaminado) não foi verificada nenhuma morte.

DISCUSSÃO

Os antissépticos adicionados a produtos biológicos devem exercer atividade bacteriostática; no presente caso a menor concentração de ácido bórico que exerceu ação bacteriostática no plasma sobre as 26 cepas estudadas foi a correspondente à concentração de 0,12 g%.

Evidentemente, 0,12 g% de ácido bórico não poderá ser considerada como sendo a menor quantidade de antisséptico que exerce ação bacteriostática, uma vez que o intervalo nas diluições de 1/800 (0,12 g%) e 1/1600 (0,06 g%) é demasiadamente grande.

É possível que a concentração de ácido bórico que exerça atividade bacteriostática no sangue seja inferior a 0,100 g%, isto considerando os resultados da atividade antibacteriana do ácido bórico no plasma sanguíneo.

Por ocasião da determinação do número de colônias em placa, o inóculo representado pelo plasma ou pelo sangue continha ácido bórico em concentrações elevadas. É possível, portanto, que a presença do antisséptico na placa tenha dificultado a proliferação de colônias. Este fato impede afirmar a atividade bactericida do ácido bórico.

As concentrações de 0,1 e 0,2 g% de ácido bórico, não exerceram atividade hemolítica nas condições estudadas; isto nos indica que o antisséptico usado apresenta grande tolerância quanto à capacidade de determinar hemólise. Estas concentrações correspondem à faixa de ação bacteriostática do antisséptico.

A concentração de 0,1 g% do antisséptico adicionado a solução ACD foi capaz de reduzir a zero a elevada letalidade observada nos grupos de camundongos inoculados com sangues contaminados sem ácido bórico, especialmente no que se refere às cepas do gênero *Pseudomonas* e *Enterobacter*. A letalidade foi menor nos grupos de animais correspondentes aos sangues contaminados por bactérias do gênero *Bacillus;* esta observação coincide com a afirmação de Pittman (1953), de que as reações transfusionais de pequena gravidade correspondem às contaminações por germes Gram positivos.



Indubitavelmente, diante da complexidade da hemoterapia, um antisséptico adicionado ao sangue deverá reunir condições muito mais amplas; assim, no que se refere à ação sobre os elementos globulares, não podemos nos restringir apenas a um simples teste de hemólise, mas sim, à fisiologia celular e neste particular não somente às hemácias, mas também aos demais componentes celulares do sangue.

Referimo-nos da mesma maneira quanto ao plasma; o simples fato de ter conservado o seu aspecto normal não indica, evidentemente, que não possa ter sofrido alterações quanto aos seus componentes. Neste particular, fazemos especial menção aos fatores de coagulação, aos componentes protéicos e enzimáticos.

Outra condição fundamental é de que o antisséptico não exerça ação tóxica sobre o organismo, nesse sentido temos informações sobre os efeitos nocivos verificados na terapêutica com doses elevadas de ácido bórico ou, ainda, quanto à administração acidental do mesmo.

Peyton e Green (1941) fazem menção à recuperação de um paciente inoculado com uma única dose de 28 g de ácido bórico por via subcutânea.

McIntyre e Burke (1937) relatam a recuperação de um paciente que recebeu 15 g de ácido bórico por via intravenosa.

Brow e col. (1936) citam um caso de administração acidental por via intravenosa de 1000 ml de solução de ácido bórico a 2% (total 20 g) sem efeitos tóxicos sérios.

Através do estudo de Pfeiffer e col. (1945) sobre o ácido bórico, pode-se verificar que somente doses elevadas levam a intoxicações graves.

Evidentemente neste sentido há necessidade de estudo meticuloso.

Conforme os nossos resultados, o ácido bórico exerce ação bacteriostática na concentração de 0,1 g%, portanto, um paciente que recebe 500 ml de sangue estaria recebendo 0,5 g do antisséptico.

Nos casos de cirurgias extensas ou de exanguino-transfusão um paciente adulto poderá receber volumes de sangue de aproximadamente 7000 ml, neste caso o paciente estará recebendo 7 g de ácido bórico.

Devem ser consideradas ainda as transfusões de pequenos volumes de sangue durante longos períodos.

Cope (1943) demonstra que pacientes com função renal normal tratados localmente com ácido bórico, podem excretar pela urina 2 g no período de 24 horas. Este mesmo autor refere que quando o tratamento é feito através de irrigações de cavidades internas a excressão na urina pode elevar-se a 2,5 g em 24 horas.

A vantagem fundamental do uso do ácido bórico como antisséptico adicionado ao sangue seria de ordem prática podendo o mesmo integrar a solução ACD, ser submetido a esterilização e armazenagem por longos períodos, sem alteração. O plasma retirado do sangue colhido com ácido bórico continua conservando as suas características bacteriostáticas.

As condições habitualmente apresentadas na prática de colheita de sangue nos levam a acreditar num risco de contaminação obrigatório.

Assim como são adicionados antissépticos em elevado número de produtos biológicos, acreditamos que no caso do sangue e do plasma também se impõe essa necessidade. Evidentemente, se forem obedecidas nos Serviços de transfusão e Bancos de Sangue normas de assepsia já aconselhadas há muitos anos, inclusive entre nós por Faria (1957), os índices de contaminação teriam diminuído consideravelmente.

O reaproveitamento de frascos de sangue e aparelhos de colheita, feito habitualmente em Bancos de Sangue, aumenta a possibilidade de contaminação devido a esterilização inadequada.

Acreditamos que o uso atual de sacos plásticos em diversos Bancos de Sangue, devido as condições técnicas que apresentam, poderiam diminuir o risco de contaminação.

Paralelamente, de acordo com Pittman (1953), a assepsia não deveria ser apenas cirúrgica, mas sim uma assepsia bacteriológica, pois os germes implicados são na sua maioria saprófitas. Estas bactérias constituem um grupo de microrganismos psicrófilos já mais ou menos definido, porém de difícil classificação.

A punção venosa do doador deverá ser precedida do uso de soluções germicidas, uma vez que os antissépticos destruiriam somente os germes patogênicos. Outra condição que se impõe é que a solução germicida a ser usada tenha a característica de uma ação rápida sobre os microorganismos, pois o tempo transcorrido desde o momento do início da antissepsia do braço do doador até a punção não ultrapassa de maneira geral 1 minuto. Isto, portanto, se soma aos inconvenientes já mencionados para a obtenção de uma amostra de sangue absolutamente estéril.

Diante destas considerações, destacamos os excelentes resultados que obtivemos com o ácido bórico adicionado como antisséptico de sangue. O ácido bórico complementa a solução preservativa ACD na proporção de 0,1 g por 100 ml de sangue, permitindo que os frascos sejam autoclavados e armazenados por longos períodos. O sangue colhido com antisséptico impediu o desenvolvimento bacteriano de 26 cepas utilizadas nos testes, não modificou o aspecto normal do sangue e quando inoculado em camundongos evitou uma elevada letalidade.

Acreditamos, portanto, que estes fatos justifiquem estudos complementares que possam trazer ao método a necessária segurança.

CONCLUSÕES

Diante de nossos resultados, nos parece lícito concluir o seguinte:

1. O ácido bórico, nas condições do teste, no plasma mantido a 4-6° durante 20 dias, exerceu ação possivelmente bactericida a partir das concentrações superiores a 0,50 g% sobre bactérias psicrófilas isoladas de sangue maciçamente contaminados, sendo 12 do gênero *Pseudomonas*, 8 do gênero *Enterobacter* e 6 do gênero *Bacillus*. No sangue total

a atividade possivelmente bactericida foi observada a partir das concentrações superiores a 0,3 g%.

2. A atividade bacteriostática do ácido bórico no plasma correspondeu as concentrações de 0,12 a 0,25 g% e no sangue nas de 0,10 a 0,20 g%.

3. Nas concentrações inferiores a 0,06 g% o antisséptico pode ser considerado inativo.

4. O ácido bórico nas concentrações de 0,10 e 0,20 g% de sangue não teve ação hemolítica, tendo o sangue conservado seu aspecto normal, principalmente no que se refere a coloração.

5. A concentração de 0,1 g% do antisséptico adicionado a solução ACD, foi capaz de reduzir a zero a elevada letalidade observada nos grupos de camundongos inoculados com sangues contaminados sem antisséptico.

6. Conforme dados compulsados na literatura referente a intoxicação do homem pelo ácido bórico, foi possível verificar que as concentrações que poderiam ser adicionadas como antisséptico no sangue são possivelmente inferiores a dose tóxica.

7. Finalmente, existem possibilidades do uso do ácido bórico na concentração de 0,1 g%, como antisséptico do sangue conservado. Entretanto, deverá ser precedido de estudos complementares que possam dar ao método a necessária segurança.

SUMMARY — The possibility was studied of using boric acid as an antiseptic agent in stored blood. Antibacterial activity in experimentally contaminated human plasma and blood maintained at 4-6°C, the influence of different concentrations on stored red blood cells maintained at 4-6°, as well as the toxic effect of contaminated blood samples containing boric acid, have been determined. Psychrophile bacterial strains isolated from contamined blood were used for the tests: 12 strains of the genus *Pseudomonas*, 8 of the genus *Enterobacter*, and 6 of the genus *Bacillus*.

The bacteriostatic activity of boric acid corresponds to concentrations of 0.12-0,25 g% in plasma, 0.10-0.20 g% in blood; the bactericidal activity corresdonds to concentrations higher than 0.3 g%. In concentrations lower than 0.66 g%, boric acid is considered inactive. In 0.10 and 0.20 g% concentrations, no hemolytic effect has been observed, and the blood retained its normal aspect mainly in respect to color. A 0.1 g% concentration of boric acid added to a ACD (Citric Acid, Sodium Citrate, Dextrose) solution reduced to zero the high lethality observed in groups of mice inoculated with contaminated blood void of the antiseptic. Final conclusions are given as to the possible use of boric acid in addition to a ACD solution in a final concentration of 0.1 g% as an antiseptic for stored blood. According to the data in literature referring to boric acid intoxication in men, it has been verified that the boric acid amounts added as an antiseptic to stored blood are far less than a toxic dosis; nevertheless, complementary studies are recommended before the method is applied.

UNITERMS — Bacterial contamination in a Blood Bank.

Boric acid as an antiseptic agent in stored blood.

SOERENSEN, B. — Contribuição para o estudo do ácido bórico como antisséptico de sangue conservado.
Mem. Inst. Butantan, 37: 17-42, 1973.

Ao Prof. Dr. Otto Guilherme Bier

À Dra. Jandyra Planet do Amaral

Ao Dr. Gastão Rosenfeld

Ao Dr. Henrique Sampaio Corrêa

Ao Dr. Luiz Augusto Ribeiro do Valle

a gratidão pela contribuição à nossa formação científica.

Dedicatória:

À Cecilia, Roberto, Marcelo e Mauricio.

Agradecimento:

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS:

Ao Orientador deste trabalho: Prof. Dr. Euclydes Onofre Martins.

Ao Prof. Dr. Domingos Delascio.

Ao Prof. Dr. Donald Wildson.

À Dra. Jandyra Planet do Amaral.

Ao Dr. Oswaldo Melone.

À Dra. Margaret Pittman.

Ao Dr. Charles R. Manclark.

Ao Dr. Luiz Rachid Trabulsi.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRÉ, E. et al. — A propos d'un accident transfusionell dù à la cantamination bacterienne du sang conservé par un bacille gram négatif. Considérations cliniques, physiopathologiques et thérapeutiques. *Bull. Soc. Méd. Hop. Paris.,* 75: 811-817, 1959.
2. BAGDASAROV apud RIVERA BANDRES, J. — *Transfusión de sangre.* Madrid, Marban Nuevas Gráficas, 1967, p. 631.
3. BÉCART, A. & PHILIPPE, B. — Le plasma humain sulfamidé. Ses avantages dans le transfusion d'urgenos en l'absence d'n donneur de sang frais. *Presse Med.,* 48: 535-537, 1940.
4. BLATRIX, CH. et al. — Action de l'oxytétracycline sur les culots d'hématies remis en suspension dans une solution conservatrice. *Transfusion,* 6: 327-332, 1963.



5. BORDEN, C. W. & HALL, W. H. — Fatal transfusion reactions from massive bacterial contamination of blood. *New England J. Med.*, 245: 760-765, 1951.

6. BOY, J. et al. — Etude clinique et biolégique d'accidents dus à la contamination du sang conservé. *Transfusion*, 1: 317-327, 1958.

7. BRAUDE, A. et al. — Studies of bacterial transfusion reactions from refrigerated blood: The properties of cold-growing bacteria. *J. Clin. Invest.*, **34**: 311-325, 1955.

8. BRAUDE, A. I. et al. -- Effects and clinical significance of bacterial contaminants in transfused blood. *J. Lab. Clin. Med.*, 29: 902-916, 1952.

9. BRAUDE, A. I. et al. — Shock-like state due to transfusion of blood contaminated with Gram-negative bacilli. Successfull treatment with antibiotics and arterenol. *Arch. Int. Med.*, 92: 75-84, 1953.

10. BROWN, W. I. et al. — Toxicity of boric acid. *JAMA*, 106 (2): 1221, 1936.

11. CHURCHMAN, J. W. apud NOVAK, M. — Use ob bacteriostatic drugs in preservation of blood for transfusion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **41**: 210-211, 1939.

12. COPE, O. — Care of vitims of the cocoanut grove fire at the Massachusetts General Hospital. *New Eng. J. Med.*, 229: 138-147, 1943.

13. DISCOMBE, G. & MEYER — Zur Frage der bakteriologischen kontrolle von Blutkonserven. *Deutsch. Med. Wschr.*, 79: 891-892, 1954.

14. FARIA, R. — Aspectos microbiológicos da Hemoterapia. *Rev. Clin. São Paulo*. 33: 6-20, 1957.

15. IBID — Sangue contaminado por bactéria psicrofílica. (*A. faecalis*). Choque transfusional não mortal. *Rev. Paul. Med.*, 52: 309-310, 1958.

16. IBID — A bacterioscopia direta pré-transfusional e sua importância clínica *Arq. Biol.*, 44 (330): 89-98, 1960.

17. GELLER, P. et al. — Experimental studies on bacterial contamination of bank blood. I. The nature of "toxicity" of contaminated blood. *J. Lab. Clin. Med.*, 43: 696-706, 1954.

18. GERMAIN, A. et al. — A propos de deux accidents transfusionnels graves par souillure bactérienne. *Mem. Acad. Chir.* (Paris), 85: 378-385, 1959.

19. GRIMBERG, A. et al. — L'action inhibitrice du citrate de soude sur le pouvoir bactéricide du sang humain. *Compt. Rend Soc. de Biol*, 123: 1045-1048, 1936.

20. HARRINGTON, C. R. & MILES, A. A. — Storage of blood for emergency. *Brit. Med. J.*, 1: 1202, 1939.

21. HEATH, F. K. & PROVINCE, W. D. — The preservation of human plasma. Report of studies with the sulfonamide compounds. *JAMA*, **118**: 1034-1037. 1942.

22. HUNWICKE, R. F. — Sulphanilamide as a preservative in stored blood. *Brit. Med. J.*, 2: 380-381, 1940.

23. JAMES, J. D. & STOKES, E. J. — Effects of temperature on survival of bacteria in blood for transfusion with a note on contamination by cold-growing organisms. *Brit. Med. J.*, 11: 1389-1395, 1957.

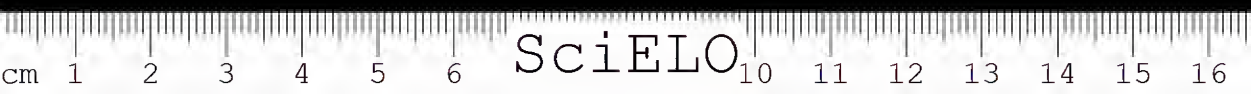
24. JAMIESON, W. A. & POWELL, H. M. apud NOVAK, M. — Use of bacteriostatic drugs in preservation of blood for transfusion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 41: 210-211, 1939.

25. LEIVA COFRÉ, H. — Accidentes mortales consecutivos a la transfusión de plasma. *Rev. Med. Chile*, 72: 942-947, 1944.

26. MASSÉ, L. et al. — A propos des accidentes dus à la transfusion de sang infecté. *Mem. Acad. Chir.* (Paris), 85: 835-389, 1959.

27. MATHES, M. — Die Verhütung bakaerieller Verunreinigungen von Blutkonserven. *Deutsch. Mes. Wschr.*, 84: 483-488, 1935.

28. MC ENTEGART, M. G. — Dangerous contaminants in stored blood. *Lancet.*, 271: 909-911, 1956



29. MC INTYRE, A. R. & BURKE, J. C. — Intravenous boric-acid poisoning in man. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 60: 112-113, 1937.

30. MACKAY, M. E. — The bacteriostatic effect of desinfectans in human serum and citrated plasma. *Brit. Med. J.*, 1: 747-750, 1941.

31. MIECZNIKOWSKI, A. & KUS, M. — Post-transfusion endotoxic shock. *Ginek. Pol.*, 37: 1223-1227, 1966.

32. MILZER, A. — Laboratory aspects of the preparation and biologic control of plasma. *New York J. Med.*, 43: 1606-1611, 1943.

33. MUNZER, G. E. et al. — False positive Coombs test due to bacterial contaminants in stored pilot tube blood. *Transfusion*, 3: 282-285, 1963.

34. NOVAK, M. — Preservation of stored blood with sulfanilamide. *JAMA*, 113: 2227-2229, 1939.

35. IBID — Use of bacteriostatic drugs in preservation of blood for transfusion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 41: 210-211, 1939.

36. IBID — The use of sulfonamide derivates. As a solution to the problem of bacterial contamination in stored plasma. *JAMA*, 118: 513-514, 1942.

37. PAGE, A. P. M. et al. — The use of placental blood for transfusion. *Lancet*, 1: 200-202, 1939.

38. PETZELT, K. — Zur Vermeidung von Transfusionsschäden bei Verwendung von Blutkonserven. *Deutsch. Med. Wschr.*, 78 (2): 1505-1506, 1963.

39. PEYTON, H. A. & GREEN, D. — Boric acid poisoning. — Case report. *Southern Med. J.*, 34: 1286-1288, 1941.

40. PFEIFFER, L. C. C. et al. — Boric acid ointment. — A study of possible intoxication in the treatment of burns. *JAMA*, 128 (4): 266-274, 1945.

41. PITTMAN, M. — A study of bacteria implicated in transfusion reactions and of bacteria isolated from blood products. *J. Lab. Clin. Med.*, 42: 273-288, 1953.

42. RIVERA BANDRES, J. — *Bases fisiologicas e indicaciones de las transfusiones de sangre y de plasma.* Madrid, Marban. Gráficas Argüelles, 1956, p. 407-408.

43. IBID — *Transfusión de sangre.* Madrid, Marban. Nuevas Gráficas, 1967, p. 631-636.

44. SANCHEZ MENDAL, L. et al. — Profuse bleeding due to transfusion of contamined blood. Report of 5 cases. *Vox. Sang.*, 6: 170-178, 1961.

45. SANTOS FREIRE, C. A. — Contaminação bacteriana em sangue conservado. *Fôlha Med.*, 50 (4): 237-248, 1965.

46. SCHIER, J. — Stored blood contaminated by bacteria as a cause of chareteristic type of septic shock. *Pol. Typ. Lek.*, 23: 907-910, 1968.

47. SHAMOV, W. N. — The transfusion of stored cadaver blood. *Lancet*, 2: 306-309, 1937.

48. SMITH, D. E. et al. — The mechanism of inactivation of mercurial antiseptics by serum, and its implications regarding the possibility of intravenous anti sepsis. *Amer. J. Med. Sci.*, 192: 790-808, 1936.

49. SOERENSEN, B. — A bacterioscopia pré-transfusional em lâmina corada pelo azul de metileno. Técnica para a sua execução. *Rev. Bras. Cir. (Bol. Oncologia)*, 50 (4): 245-249, 1965.

50. SOERENSEN, B. et al. — Acidentes transfusionais fatais por sangue contaminado. Aspecto bacteriológico. *Rev. Bras. Cir. (Bol. Oncologia)*, 50 (2): 134-137, 1965.

51. SOERENSEN, B. & SAMPAIO CORREA, H. — Importância da temperatura no desenvolvimento de germes em sangue conservado. *Rev. Bras. Cir. (Bol. Oncologia)*, 49 (6): 356-364, 1965.

52. SOERENSEN, B. et al. — Determinação da contaminação bacteriana em sangue estocado através da dosagem de glicose com tira reagente. *Mem. Inst. Butantan*, 36: 51-56, 1972.

53. SPIVAK & PELISHENKO — Sterilization of conserved blood with methylene blue. *JAMA*, 115 (1): 169- 1940.

54. SPOONER, apud RIBERA BANDRES, J. — *Transfusión de sangre*. Madrid, Marban Nuevas Gráficas, 1967, p. 631.

55. STEVENS, Jr., A. R. et al. — Fatal transfusion reactions from contamination of stored blood by gold-growing bacteria. *Ann. Int. Med.*, 39: 1228-1239, 1953.

56. U. S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION, AND WELFARE — Public Health Service. National Institutes of Health (Bethesda, Maryland). Minimum Requirement. Normal human plasma. 9th Revision, May 15, 1952.

57. VONNKILCH apud RIVERA MANDRES, J. — *Transfusión de sangre*. Madrid, Marban Nuevas Gráficas, 1967, p. 631.

58. WHITBY apud RIVERA BANDRES, J. — *Transfusión de sangre*. Madrid, Marban Nuevas Gráficas, 1967, p. 631.

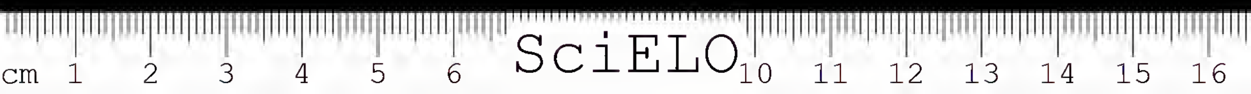
59. YUDIN, S. S. — Transfusion of stored cadaver blood. Practical considerations: The first thousand cases. *Lancet*, 2: 361-366, 1937.

ANEXO I

Relação das substâncias citadas no texto. Seus nomes comerciais, sinônimos e fórmula química.

Albucid sódico ®	(N-acetil-sulfanilamida sódica)
Mertiolato ®	Timerosal (etilmercúrio-tiosalicilato de sódio)
Metaphen ®	Nitromersol (4-nitro-3-hidroxi-mercuri-o-cresol)
Neosalvarsan ®	Neoarsphenamina (3-diamino-4-dihidroxo-arsenobenzeno-metanal sulfoxilato de sódio)
Nipagin ®	(metil-p-hidroxibenzoato)
Proflavina	(3,6-diaminoacridínio cloreto)
Prontosil ®	Sulfamidocrisoidina (4-Sulfamil-2,4-diaminoazobenzeno)
ivanol ®	Ethacridina (2,5-diamino-7-etoxiacridina)
Sulfidin ®	Sulfapiridina (2-sulfanilamido-piridina)
Tripaflavina ®	Acriflavina (mistura de 2,8-diamino-10-metil acridínio cloreto e 2,8-diamino acridina)
Urotropina ®	Metenamina (Hexametileno-tetramina)

Recebido para publicação em 23.VII.73.
Aceito para publicação em 01.VIII.73.



Mem. Inst. Butantan
37: 43-82, 1973

A ÁREA DE EDUCAÇÃO DO INSTITUTO BUTANTAN *

ROSA PAVONE PIMONT**

Seção de Cursos do Instituto Butantan

RESUMO — Baseada na legislação estadual, a autora realizou estudo do desenvolvimento do Instituto Butantan desde sua fundação até a presente estruturação, com ênfase na evolução das atividades didáticas da Instituição.

Sendo as referidas atividades relacionadas com Saúde Pública, Ciências Biológicas e Médicas, foi proposto um projeto de ordenação e ampliação da área de educação, fundamentando-se nas possibilidades do Instituto Butantan e na Nova Lei de Diretrizes e Bases do Ensino no Brasil. O projeto refere-se, de forma mais ampla possível à contribuição da Instituição à Educação e ao Ensino, principalmente a Educação em Saúde e a formação na área das Ciências Biomédicas nos diferentes gráus de escolaridade.

O fluxegrama apresentado sugere linhas de trabalho a institutos de pesquisa similares.

UNITERMOS — Instituto de Pesquisas; Educação em Saúde; Formação profissional em Ciências Biomédicas.

1. INSTITUTO BUTANTAN: ÁREAS DE ATUAÇÃO

O Instituto Butantan, atualmente órgão da Coordenadoria de Serviços Técnicos Especializados da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, teve suas origens no Instituto Serumtherápico, fundado na Fazenda Butantan, pelo cientista brasileiro Dr. Vital Brazil em 1899. Nesta época este pesquisador desenvolvia trabalho pioneiro relacionado com a produção de soros hiperimunes.

Em 1925 foram anexados ao Instituto Serumtherápico o Instituto Vacinogênico e o Instituto Bacteriológico. A fusão destes três institutos recebeu o nome de Instituto Butantan e, os objetivos da instituição que eram preparar medicamentos, estudar e extrair princípios tóxicos medicamentosos de vegetais e animais, foram ampliados, incluindo a educação sanitária do povo.

No desenvolvimento da estrutura de serviços do Estado, o Instituto Butantan subordinou-se em 1931 ao Departamento de Saúde Pública, tendo sido organizado como Centro de Medicina Experimental com finalidade de realizar trabalhos científicos sobre animais venenosos, sobre patologia humana, principalmente fenômenos de imunidade, preparação de produtos biológicos e organização de cursos práticos de especialização científica.

Com a criação, em 1934, da Universidade de São Paulo passou a constituir órgão complementar da mesma.

Em 1938, foi criado o Departamento de Saúde do Estado e o Serviço de Laboratórios de Saúde Pública desse Departamento incluia o Instituto Butantan.

* Parte da tese de doutoramento aprovada pela Faculdade de Educação da Universidade de São Paulo, em 1973.
** Chefe da Seção de Cursos — Instituto Butantan.

Endereço para correspondência:
C.P. 65, São Paulo, Brasil.

Nas subsequentes reformas administrativas o Instituto Butantan, em 1942, subordinou-se à Secretaria da Educação e Saúde Pública e, em 1944, foi transferido para a recém-criada Secretaria de Estado dos Negócios da Saúde Pública e da Assistência Social.

Em 1959, com a criação do Conselho das Instituições de Pesquisa do Estado de São Paulo, foi incluído no mesmo, entre outros institutos.

Com a aceleração do desenvolvimento científico, sócio-econômico e cultural do Estado de São Paulo, o Instituto Butantan expandiu-se e tornou-se necessária uma re-organização que agrupasse suas atividades em divisões técnicas, seções e setores para um funcionamento harmônico de suas atividades. Com esse objetivo, em 1962, foi reorganizado, sendo redefinidas suas finalidades. Após várias tentativas, foi aprovada a reestruturação atual em 1968.

Atualmente o Instituto Butantan desenvolve pesquisas científicas de âmbito internacional, abrangendo os campos da Microbiologia, Biologia, Bioquímica, Farmacologia, Genética, Patologia e Fisiologia.

Além das pesquisas, o Instituto é encarregado de suprir o Estado de São Paulo de vacinas para a varíola, tétano, tuberculose, coqueluche, raiva, tifo e febre maculosa, entre outras. Em ocasiões de surtos epidêmicos, colabora nos programas de imunização da comunidade, promovidos pelo governo, fornecendo as vacinas ao Estado e, em caso de necessidade, ao País.

O Instituto também fabrica soros específicos para tratamento de: picados por animais peçonhentos, raiva, tétano, difteria, botulismo e gangrena. Sendo padrão em tecnologia de produtos immoterápicos, assessora indústrias farmacêuticas governamentais e particulares.

No conjunto de prédios, onde funciona o Instituto Butantan, existe um hospital para socorros de urgência a picados por animais venenosos e que, através de médicos e enfermeiras especializados, atende dia e noite a todas as pessoas acidentadas que o procuram.

Somadas às atividades de pesquisa e produção, a Instituição desenvolve atividades de extensão cultural; possui um museu especializado que é continuamente visitado por cientistas, estudantes, populares e turistas de vários lugares do mundo; organiza cursos, aulas, estágios e treinamentos para estudantes dos diferentes graus, fornecendo material didático e bolsas de estudo; possui uma biblioteca com acervo de 7.850 livros, 28.250 periódicos e 22.261 teses e separatas no campo da Biologia e da Medicina; publica anualmente os trabalhos realizados pelos seus cientistas em *Memórias do Instituto Butantan*.

Todas as atividades citadas desenvolvem-se conjuntamente, lideradas por oitenta e três técnicos de nível superior e organizadas numa estrutura composta de seis grandes Divisões:

Divisão de Biologia
Divisão de Microbiologia e Imunologia
Divisão de Patologia
Divisão de Ciências Fisiológicas e Química
Divisão de Extensão Cultural
Divisão de Administração.

Destas seis divisões, quatro desenvolvem atividades técnicas de pesquisa e produção: Biologia; Ciências Fisiológicas e Química; Microbiologia e Imunologia; Patologia.

Divisão de Biologia: é composta de dois serviços e uma seção que desenvolvem trabalhos de pesquisa em três setores da Biologia: Animais Peçonhentos Genética e Parasitologia.

O Serviço de Genética, dessa divisão, realiza pesquisas em genética animal a respeito de vertebrados inferiores. Existe também uma Seção de Genética Humana. São inúmeros os trabalhos internacionais publicados por este serviço, além de teses desenvolvidas nos seus laboratórios.

A Seção de Parasitologia possui preciosa coleção de ácaros e desenvolve pesquisas em sua área específica.

O Serviço de Animais Peçonhentos conta com duas seções, que são incumbidas da extração sistemática de veneno de serpentes, aranhas e escorpiões, venenos estes que são utilizados para produção dos soros específicos antipeçonhentos e em trabalhos de pesquisa.

Nesta divisão são desenvolvidos trabalhos de pesquisa a respeito de serpentes e a mesma conta com uma coleção de aproximadamente 40.000 exemplares de serpentes conservadas, já estudadas e classificadas.

Em algumas regiões do Estado de São Paulo e do Brasil, acidentes por serpentes e artrópodos peçonhentos constituem problema de Saúde Pública, razão pela qual assume grande importância a fabricação desses soros pelo Instituto Butantan.

Esta Divisão é encarregada da recepção e cadastramento de serpentes, aranhas e escorpiões que chegam ao Instituto, vindos de todo o Brasil e de outros lugares do mundo.

Como os venenos animais são preciosos para os estudos e a produção do Instituto, são fornecidas caixas, laços especiais e instruções sobre apreensão desses animais produtores de venenos; o transporte por via férrea é gratuito de todo e qualquer recanto do país.

A Divisão mantém um sistema de permuta de soro por animais peçonhentos recebidos.

Divisão de Microbiologia e Imunologia comporta os serviços de Bacteriologia, Imunologia, Virologia e Controle e Técnicas Auxiliares, serviços responsáveis pela área de produção de imunoterápicos. As vacinas originárias de bactérias e vírus são aí produzidas, dentro do mais alto padrão de tecnologia de produtos biológicos. Além das vacinas são produzidos soros hiperimunes específicos para tratamento de diversas doenças já citadas.

Os imunoterápicos são fabricados em escala industrial, uma vez que são destinados à comunidade do Estado de São Paulo, através da Secretaria de Estado da Saúde.

Essa Divisão abrange o Serviço de Técnicas Auxiliares e de Controle, que realiza o controle químico e o controle biológico de aproximadamente 50 produtos diferentes, preparados em todo o Instituto Butantan.



Existem ainda os Setores de Distribuição, Acondicionamento e Expedição dos produtos.

Divisão de Patologia — subordina-se à esta Divisão o Hospital Vital Brasil para socorros de urgência a picados por animais peçonhentos. O tratamento é inteiramente gratuito e a internação se prolonga até o completo restabelecimento do doente. Este hospital possui registro de atendimento e tratamento de acidentes desde sua função, em 1945, num total de aproximadamente 33.000 casos.

Os casos estudados fornecem importantes dados para pesquisa dos efeitos dos envenenamentos animais em patologia humana. Desenvolvem-se, nesta divisão, trabalhos de pesquisa ligados à Hematologia, Fisiopatologia e Anatomia Patológica.

Divisão de Ciências Fisiológicas e Química — eminentemente uma Divisão de pesquisa pura de âmbito internacional, constitui-se de quatro Serviços: Bioquímica, Farmacologia, Fisiologia e Química Orgânica. É a divisão mais solicitada por estudantes universitários interessados na aprendizagem da metodologia da pesquisa científica.

Desenvolve trabalhos sobre propriedades de venenos animais e sobre Química de produtos naturais e Química Medicinal. É também encarregada da produção de quimioterápicos para tratamento da hanseníase.

Como serviços de apoio à essas divisões técnicas, o Instituto possui:

a) uma Seção de Microscopia Eletrônica que, além de atender a todas as linhas de pesquisa que a solicitam, desenvolve trabalhos específicos em microscopia eletrônica em colaboração com universidades e outros laboratórios especializados;

b) a Fazenda São Joaquim, onde estão os cavalos, vitelas e carneiros para produção dos soros e vacinas, sendo que os animais de pequeno porte são criados na própria Instituição;

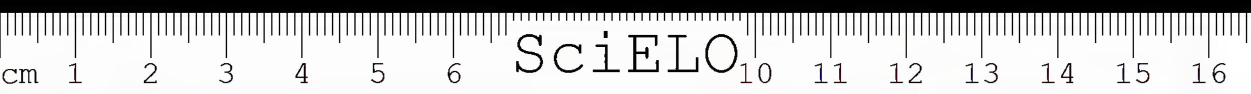
c) o Biotério, subordinado ao Serviço de Veterinária, é encarregado da criação de animais de laboratório. Camundongos, ratos, cobaias e coelhos são aí criados dentro de preceitos científicos a fim de alcançarem a homogeneidade necessária e o padrão exigido para testes de laboratórios;

d) Laboratórios especiais, que estão sendo organizados na medida do desenvolvimento de determinadas linhas de pesquisa;

e) Oficinas de mecânica de precisão e vidraria especializada, que realizam os serviços de manutenção dos laboratórios.

Estas Divisões atestam o desenvolvimento técnico científico que o Instituto Butantan atingiu em seus 70 anos de existência.

Divisão de Extensão Cultural — constituida de três seções: Museu, Cursos e Biblioteca e Divulgação tem por objeto informar a comunidade sobre as realizações do Instituto.



O Museu, além das atividades já mencionadas anteriormente, através de um setor de Taxidermia fornece a estudantes e escolas material fixado (serpentes, aranhas, escorpiões) para fazerem parte de Museus escolares ou feiras de ciências. Atende a turistas realizando demonstrações de extração de venenos de serpentes vivas, o que sempre causa grande admiração aos visitantes.

São promovidos, pela Seção de Cursos, treinamentos de médicos, enfermeiras, farmacêuticos, militares, estudantes, nas especialidades desenvolvidas na Instituição. São organizados cursos e aulas sobre vacinas, soros, saúde pública e é feita a tradução dos objetivos da Instituição a alunos de diferentes graus.

Visitas aos laboratórios, acompanhadas por técnicos especializados, são organizadas para grupos de estudantes ou profissionais da área das ciências biomédicas. Estágios orientados fazem parte da contribuição que o Instituto, através de sua Seção de Cursos, dá às universidades nacionais e estrangeiras.

Orientação para trabalhos escolares e elaboração de material audiovisual também são atividades desta seção.

O Instituto Butantan, sendo instituição complementar da Universidade de São Paulo, mantém contatos culturais e didáticos com a mesma.

A Biblioteca faz parte do grupo de bibliotecas biomédicas do Estado de São Paulo e, além de suas atividades específicas, colabora na organização de palavras proferidas por cientistas convidados ou do próprio Instituto. Supervisiona o setor de Gráfica e Encadernação, que colabora na difusão cultural imprimindo bulas e trabalhos científicos.

Divisão de Administração — abrange todos os serviços de infraestrutura tais como: finanças. pessoal, material, compras, zeladoria e comunicações.

Esta Divisão segue os moldes da administração pública, tentando adequar à mesma as tão diversas e complexas atividades do Instituto.

Os objetivos atuais do Instituto Butantan podem ser resumidos em:

a) *Instituição de Saúde Pública* — através da produção de imunoterápicos e do Hospital Vital Brasil que, funcionando 24 horas ininterruptamente, atende à população.
b) *Instituição de Pesquisa Biomédica* — através do desenvolvimento de trabalhos científicos de cunho internacional. As pesquisas iniciais, baseadas nos temas básicos de Venenos Animais e Animais Peçonhentos, desenvolveram-se a tal ponto que, atualmente, existem inúmeros laboratórios ligados a Genética. Farmacologia, Fisiologia, Patologia, Biologia, Bacteriologia e Imunologia;
c) *Instituição complementar da Universidade de São Paulo* através de organização de cursos que constituem matérias optativas ou créditos para mestrado e doutorado. Além disso é instituição ligada à Educação para a Saúde e à formação de especialistas em diferentes níveis nos ramos da Ciência cultivados no Instituto.
d) *Instituição de assessoria tecnológica a indústrias privadas* — na fabricação de imunoterápicos.

2. EVOLUÇÃO DAS ATIVIDADES DIDÁTICAS DO INSTITUTO BUTANTAN

Na intenção de situarmos os objetivos do Instituto ligados à educação, realizamos um levantamento de sua legislação — desde 1901 até 1971 — procurando detectar os objetivos educacionais e através deles depreender a evolução didática da instituição.

Após o estudo e análise de 26 decretos e leis concluimos que sempre houve uma preocupação de extensão à comunidade dos seus trabalhos teóricos e práticos, através de atividades educativas.

No início, notamos que a preocupação era de informação e divulgação, estruturando-se mais tarde até culminar com trabalho educativo e de formação especializada.

Descreveremos, a seguir, a organização legal do Instituto e a evolução de sua atividade didática, selecionando, entre os 26 decretos, decretos-leis e leis, os que se referem especificamente às atividades didáticas.

Decreto n.º 878-A de 23/2/1901 — dá organização ao Instituto Serumtherápico de Butantan.

Decreto n.º 3876 de 11/7/1925 — reorganiza o Serviço Sanitário e repartições dependentes.

Capítulo X — do Instituto Butantan.

Artigo 59 — "Caberão a essa seção as atribuições dos institutos cuja fusão resulta... na obra de educação sanitária do povo no tocante à instalação de museus".

Neste decreto a instituição aparece pela primeira vez com o nome de Butantan, resultando da fusão de 3 Institutos: o Serumtherápico, o Vacinogênico e o Bacteriológico.

A partir desta época, surgiu a preocupação, por parte de um Instituto de pesquisa altamente especializado, com a educação.

Mais tarde o *Decreto 4941 de 21/3/1931* reorganiza o Instituto Butantan e redefine seus objetivos. No Capítulo I — da organização e fins do Instituto *Artigo 1.º* — O Instituto Butantan, reorganizado como um centro de Medicina Experimental, subordinado à Secretaria da Educação e da Saúde Pública, tem por fim:

Letra h — "organizar e manter cursos práticos de especialização e de divulgação científica dentro de suas finalidades".

Finalidades na época — trabalhos científicos sobre animais venenosos, patologia humana, principalmente fenômenos de imunidade, preparação de produtos biológicos, etc....

Notamos que entre os dois decretos citados houve uma mudança. De mera informação através de museus, objetiva-se no segundo a organização de cursos estruturados nas diversas áreas desenvolvidas na Instituição.

Decreto n.º 6283 de 25/1/1934 — cria a Universidade de São Paulo e dá outras providências.

Título II

Artigo 4.º — além das Escolas, Faculdades e Institutos referidos no artigo anterior, concorrem para ampliar o ensino e a ação da Universidade.
Letra C — O Instituto Butantan

Inicia-se a vinculação à Universidade não só no campo da pesquisa mas no campo da formação especializada. A aproximação entre o Instituto Butantan e a Universidade de São Paulo tornar-se-ia, infelizmente, mais formal do que efetiva.

Decreto n.º 9393 de 5/8/1938 — organiza o Serviço de Laboratórios de Saúde Pública do Departamento de Saúde e dá outras providências.

Artigo 1.º

Parágrafo 2.º — integram a Divisão de Produção os atuais Institutos Butantan, ...

Artigo 2.º — ao serviço de laboratórios de saúde pública compete.

Letra C — "Organizar e manter cursos práticos de especialização científica e de Saúde Pública".

Letra D — colaborar com a Universidade de São Paulo, dentro das finalidades dos laboratórios de Saúde Pública.

Decreto n.º 9437 de 22/8/1938

Artigo 1.º — Ao serviço de laboratório de Saúde Pública, dependência do Departamento de Saúde do Estado, com sede no Instituto Butantan, compete —
Letra C — colaborar com a Universidade de São Paulo...

Nesta época de grande valorização do sanitarismo o Instituto, sendo órgão de saúde pública, foi considerado competente para a ministração de cursos regulares.

Decreto Lei n.º 15094 de 11/10/1945 — reorganiza o Instituto Butantan,......

Artigo 2.º — ao Instituto Butantan compete...

Letra E — organizar cursos de aperfeiçoamento e colaborar com a Universidade de São Paulo, como instituição complementar desta, sem prejuízo de sua autonomia ou de suas finalidades.

Os artigos citados situam o relacionamento do Instituto com a Universidade de São Paulo, demonstrando sempre uma intenção e um interesse na área de educação e ensino. A relacionamento administrativo não existia, apenas o cultural.

Decreto n.º 26979 de 11/12/1956 — criação do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan.

Artigo 2.º

Item VII — "contribui para a realização de cursos do Instituto".

A esta altura já havia cursos regulares, que serão demonstrados no capítulo de atividades de Educação realizadas. A contribuição do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan era o fornecimento de bolsas para os melhores alunos de cada curso de especialização e o pagamento dos professores.

Nesta fase analítica, nosso interesse maior é demonstrar a evolução da área já existente mas não definida estruturalmente.

Decreto n.º 40996 de 6/11/1962 — dispõe sobre a organização do Instituto Butantan da Secretaria da Saúde Pública e da Assistência Social e dá outras providências.

Artigo 1.º — O Instituto Butantan...

... compreende a seguinte organização.

Item XVI — Seção de Cursos Técnicos e Especializados.

O Dr. Flávio da Fonseca, então Diretor Técnico da Instituição, compreendendo a importância da formação de técnicos nas áreas especializadas cultivadas no Instituto Butantan e com fins de recrutamento de pessoal técnico superior na área biomédica, inclui de forma estruturada a área de Ensino no Instituto.

Neste momento da evolução didática da Instituição, a preocupação era mais de formação profissional, através de cursos ao nível de pós-graduação. Na ocasião ainda não havia a definição de pós-graduação no sentido que existe hoje e os cursos receberam o nome de cursos de especialização ao nível de pós-graduação.

Decreto n.º 50404 de 23/9/1968 dispõe sobre a organização do Instituto Butantan.

Artigo 8.º — Cria de Extensão Cultural.

Letra C — Seção de Cursos.

Nesta oportunidade abriu-se um campo maior para a educação no Instituto. Não apenas cursos regulares mas várias atividades educativas começaram a desenvolver-se: organização de estágios, promoção de treinamentos, orientação para trabalhos escolares, elaboração de material audiovisual. Essas atividades começaram a ser desenvolvidas e coordenadas pela Seção de Cursos.

Todas essas atividades desenvolveram-se sob temas ligados à Saúde Pública e Ciências Biomédicas partindo de solicitações da Universidade de São Paulo, de outras Universidades, escolas de vários locais, alunos de dife-

rentes níveis, grupos de militares, firmas comerciais, enfim, diferentes grupos da comunidade.

No caso da Universidade foram oferecidas matérias optativas para graduação, disciplinas constituintes de créditos para a pós-graduação, além de estágios nos laboratórios especializados.

No caso das escolas de nível médio, aulas, estágios, orientação para trabalhos, treinamento, além de bolsas para alunos de nível médio com objetivo de iniciação científica. Nos demais casos, segundo as solicitações dos grupos, várias modalidades educativas.

Nesta ocasião abriu-se concurso para as chefias técnicas e, para a seção de cursos foi selecionado um educador com especialidade na área biomédica.

Decreto n.º 52182 de 16/7/1969 — dispõe sobre a organização da Secretaria de Estado da Saúde.

Capítulo IX — "A Coordenadoria de Serviços Técnicos Especializados compreende:

item IV — Instituto Butantan

Artigo 108 — À Coordenadoria compete:

Item V — Educação Sanitária

Item VI — formação e adestramento de pessoal em nível central nas suas áreas especializadas.

Decreto n.º 52214 de 24/7/1969 — dispõe sobre a regulamentação do Decreto n.º 50404, de 23 de setembro de 1968, que organizou o Instituto Butantan e dá outras providências.

Tendo a Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, sido reestruturada posteriormente ao Instituto Butantan, seus objetivos entraram em concordância com os já estipulados. A nosso ver, os ítens V e VI referem-se também ao Instituto Butantan, uma vez que esta Coordenadoria abrange outros Departamentos e Institutos.

Nesta unidade tivemos a intenção de apresentar a evolução da atividade didática do Instituto através da legislação.

Julgamos que a citação cronológica da referida legislação por sí só faculta uma visão panorâmica da evolução das atividades didáticas da Instituição, que seguiu um processo de desenvolvimento histórico sofrendo as influências de todo um contexto social e cultural em desenvolvimento.

É fora de dúvida, que em todas as reformas, nas quais a instituição ora subordinava-se à Secretaria da Saúde ora à da Educação, inclusive à Secretaria de Educação e Saúde , suas atividades educacionais embrionárias ligadas à Saúde Pública e ciências biomédicas desenvolveram-se a ponto de constituir uma área dentro da Instituição.

3. ATIVIDADES DE EDUCAÇÃO E ENSINO REALIZADAS

No item anterior foi exposto, em ordem cronológica, o desenvolvimento da atividade didática da Instituição.

Propomo-nos, a esta altura um relato das atividades já realizadas, segundo as diferentes modalidades das mesmas.

3.1. *Atividades de divulgação e informação*

Para as atividades de divulgação e informação, desde seus primórdios o Instituto possui um museu de animais peçonhentos que até hoje serve de recurso didático para a área de educação. Além de um atendimento à população através de *stands* e animais peçonhentos conservados ou vivos, a Instituição sempre se preocupou com a educação da população num sentido de prevenção de acidentes por animais peçonhentos.

O Instituto Butantan ficou sendo conhecido por ser a Instituição que pela primeira vez no mundo preparou o soro antiofídico. Baseadas nessa especialidade, criaram-se atividades de informação e educação da população no sentido da prevenção e do tratamento de acidentes provocados por cobras, aranhas e escorpiões.

Sendo o problema dos acidentes por animais peçonhentos um problema de saúde pública, as atividades de informação e divulgação visaram em última análise a saúde da comunidade e, portanto, tratava-se de educação para a saúde.

Na medida da demanda, a população era atendida através de demonstrações realizadas no Museu e nos serpentários do Instituto, sendo que para os casos de acidentes existia ainda, um Hospital de primeiros socorros, que também colaborava no sentido de instruir a população.

3.2. *Cursos de especialização*

Com o desenvolvimento da instituição, que estudava os temas: Venenos animais e Animais peçonhentos sob vários enfoques (bioquímico, patológico, zoológico, genético, etc.), surgiu a grande necessidade da *formação* de técnicos especializados que desenvolvessem a pesquisa biomédica nessa área.

A universidade poderia dar a formação básica, mas a formação especializada para um trabalho efetivo nos laboratórios de pesquisa teria que partir da própria Instituição.

Dentro deste critério, em 1942 foi organizado pelo Instituto Butantan, um curso de aperfeiçoamento denominado "Patologia Experimental", que deveria ser aprovado pela Universidade de São Paulo, uma vez que a Instituição se constituia um órgão complementar da mesma.

As atividades didáticas que até então eram difusas, descontínuas, assistemáticas e que se constituiam em atendimentos a grupos esporádicos, interessados principalmente em ofidismo, começaram a ser sistematizadas, com o objetivo de uma regulamentação das mesmas.

Em março de 1942 o Instituto Butantan propôs ao Conselho Universitário da Universidade de São Paulo a aprovação do curso de aperfeiçoamento para técnicos superiores do Instituto Butantan, através do Diretor Geral do Departamento de Saúde, curso este aprovado no mesmo ano.

O *curriculum* era constituido das seguintes disciplinas:

Imunologia
Bacteriologia
Parasitologia
Virus filtráveis
Animais venenosos.

Somente em 1953 foi realizado o primeiro curso de Patologia experimental, sendo, nesse intervalo, continuadas as atividades esporádicas e assistemáticas de atendimento ao público e a grupos de alunos.

Em dezembro de 1953 foi reorganizado o curso de Patologia Experimental que constou de 1 ano letivo de Curso Básico Experimental com as disciplinas:

Estatística
Bioquímica
Fisiologia
Farmacodinâmica

e mais um ano letivo de um curso de especialização, a escolher:

Anatomia Patológica
Bioquímica
Hematologia
Imunologia e Bacteriologia
Ofiologia e Zoologia médica
Parasitologia
Virulogia

Sendo uma das condições para a admissão ao curso o diploma universitário ou curriculum científico, o aluno aprovado recebia o título de especialista, pois o curso era considerado de pós-graduação universitária.

Na época não haviam sido definidos, como o são atualmente, os cursos de pós-graduação.

Os professores dos cursos de especialização eram os cientistas do Instituto Butantan ou professores convidados e as exigências desses cursos variavam de acordo com cada especialista responsável pelo mesmo, incluindo estágios, participação nos programas de pesquisa e publicação de trabalhos científicos.

Em 1955, foi convencionado entre a Universidade de São Paulo e o Instituto Butantan que os cursos de especialização teriam aprovação de programa e docentes a cada triênio.

Esses cursos visavam, além da formação especializada de técnicos de nível superior nas áreas cultivadas especialmente no Instituto Butantan, a formação de especialistas para futuro recrutamento da própria Instituição.

Em 1962 foi pela primeira vez estruturada a área educação como seção de cursos técnicos e especializados, encarregada de organizar e coordenar cursos no Instituto Butantan.

Na medida do interesse de universitários recém-formados em biociências e ciências biomédicas e no desenvolvimento das várias seções do Instituto, foram organizados pelo Instituto Butantan e aprovados pelo Conselho da Universidade de São Paulo, além dos 7 cursos já aprovados e em funcionamento, mais 4 cursos de especialização: em 1958 o de Artropodologia, em 1962 o de Bioestatística e o de Genética, em 1965 o de Microscopia Eletrônica, num total de 11 cursos de formação especializada.

Sendo assim, foram ministrados, no período de 1952 a 1965, 39 cursos de especialização ao nível de pós-graduação e na área das ciências biomédicas (Tabela I).

No período de 1962 a 1963 o Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan reservou 4 bolsas anuais aos alunos dos cursos de especialização, uma vez que estes cursos objetivavam a formação de pesquisadores.

3.3. *Cursos de atualização e divulgação sobre animais peçonhentos*

Paralelamente a esses cursos de especialização foram organizados e realizados cursos de divulgação e atualização sobre animais peçonhentos. Estes cursos constituiram-se numa sistematização do atendimento didático a grupos de estudantes universitários, médicos, enfermeiras, militares ligados ao trabalho de campo, como os oficiais do Serviço de Busca e Salvamento da Força Aérea Brasileira — FAB; grupos de funcionários de firmas onde os acidentes por animais peçonhentos eram freqüentes, etc...

Os cursos, em número de 37, no período de 1957-1966 foram ministrados no Estado, no Brasil e no Exterior (Tabela 2).

Basicamente eram constituidos de 4 aulas, dentro dos seguintes temas:

— Reconhecimento e captura de ofídios peçonhentos.
— Reconhecimento e captura de artrópodos peçonhentos.
— Preparação de soro específico para acidentados por animais peçonhentos.
— Primeiros socorros e tratamento de urgência a picados por animais peçonhentos.

As aulas variavam em nível e número, a depender do grupo solicitante.

Os cursos, tanto os de especialização como os de divulgação, foram ministrados por técnicos superiores do Instituto, especialistas nas diferentes áreas, uma vez que nos mesmos se incluiam Biologia, Patologia e Tecnologia.

Atualmente esses cursos constituem a maioria das solicitações, pois apenas o Instituto Butantan possue os recursos materiais, técnicos e humanos para ministrá-los. Este tipo de curso se adapta ao grupo solicitante.

TABELA 1

Cursos de especialização realizados no Instituto Butantan (1952-1965)

Especialidade / Ano	Número de alunos inscritos											
	Patol. Exper.	Bacter. e Imunol.	Artropologia	Bioestatística	Bioquímica	Genética	Hematologia	Ofiologia	Parasitologia	Virologia	Total de alunos	Total de cursos
1952-1953	19	—	—	—	—	—	—	—	—	—	19	1
1954	2	—	—	—	3	—	3	5	—	—	13	4
1955	—	1	—	—	3	—	4	2	3	—	13	5
1957	—	15	—	—	11	—	12	7	3	3	51	6
1958	—	1	5	—	1	—	3	1	—	1	12	6
1959	—	3	—	—	5	—	3	2	—	—	13	4
1961	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	1
1963	—	—	11	28	2	14	—	—	—	—	55	4
1964	—	—	4	—	—	3	15	3	—	—	25	4
1965	—	—	3	13	—	—	2	3	—	—	21	4
Totais	21	20	23	41	25	17	42	23	6	5	223	39

Fonte: Seção de Cursos do Instituto Butantan.

TABELA 2

Cursos de divulgação e atualização sobre animais peçonhentos (1957-1966)

Ano	N.º de cursos	N.º de aulas
1957	3	11
1958	5	14
1959	2	8
1960	4	6
1961	2	3
1962	5	16
1963	6	40
1964	7	26
1965	2	8
1966	1	4
Totais	37	126

Fonte: Seção de Cursos do Instituto Butantan.

Em 1967, devido ao grande crescimento da Instituição e da carência de recursos humanos especializados (uma vez que a maioria dos alunos de especialização tinha maiores chances de salários e *status* nas universidades), a Instituição passou por uma crise enquanto lutava para se transformar em Fundação. Nos anos 1967/1968 as atividades educativas tornaram-se quase nulas no Instituto, a espera de uma reforma básica baseada na redefinição dos objetivos da instituição.

O Decreto n.º 50404 de 23/9/1968 finalmente reestruturou o Instituto Butantan em seus objetivos.

Segundo o Decreto n.º 52214, de 24/7/1969, que regulamentou o Instituto Butantan, na Divisão de Extensão Cultural, ao lado da Seção de Biblioteca e Divulgação e da Seção de Museu, foi colocada a Seção de Cursos, com as seguintes atribuições:

a) Regulamentação dos cursos programados pelo Conselho Superior;

b) Trabalhos práticos referentes a processos de recrutamento e seleção de candidatos aos vários cursos;

c) Execução de qualquer trabalho para a divulgação e realização dos cursos;

d) Execução de trabalhos de documentação referentes aos cursos do Instituto Butantan".

Essas atribuições, limitantes, para uma Seção de Educação, constituem entretanto, apenas lembretes das atividades a serem desenvolvidas. Na fase de implantação da nova reforma várias atividades didáticas foram organizadas e desenvolvidas pela Seção de Cursos, baseadas não somente nas atribuições da Seção mas também e principalmente, nos objetivos do Instituto Butantan.

4. ATIVIDADES ATUAIS DA SEÇÃO DE CURSOS

A partir de 1969 continuaram a ser desenvolvidas atividades educacionais na área da Saúde Pública e na das biociências e ciências biomédicas.

Dentro das condições existentes foram organizadas as seguintes atividades:

a) Trabalhos de pesquisa educacional (anexo no final)

b) Curso sobre:

"Fabricação de produtos imunoterápicos", destinado a técnicos superiores. Esse curso complementou créditos para curso de pós-graduação da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo, em 1970.

c) Curso de Ofiologia e curso de Aracnologia que constituiram matérias optativas para os cursos de graduação universitária do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em 1971.



d) Curso de Bioquímica de Enzimas Proteolíticas, que constituiu parte da disciplina Bioquímica do curso de Ciências Biomédicas da Escola Paulista de Medicina, em 1971.

e) Conjunto de aulas organizado segundo solicitação, interesse e nível grupos de alunos: médicos, enfermeiros, agrônomos, militares. Ex.: Animais Peçonhentos; Saúde Pública; Soros e Vacinas.

f) Atendimento didático através de aulas a alunos de nível médio.

g) Orientação para trabalhos escolares a respeito de vacinas, soros, animais peçonhentos, etc., para alunos de todos os níveis.

h) Orientação para organização de material didático: *stands* para feiras de ciências, álbum seriado, roteiro para coleções de diapositivos, etc.

i) Organização e coordenação de estágios nos diferentes laborórios do Instituto.

j) Organização e coordenação de treinamento para diferentes grupos de pessoas — escolares ou não.

Todos os dados apresentados estão documentados na Seção de Cursos do Instituto Butantan, mas é fora de dúvida que, outras atividades que podemos chamar de didáticas foram realizadas embora não estejam oficialmente registradas. Limitamo-nos a fornecer os dados passíveis de comprovação.

Após análise desta unidade concluímos que:

a) a partir de atividades didáticas assistemáticas, o desenvolvimento da Instituição levou a uma organização e estruturação dessas atividades culminando na atual Seção de Cursos;

b) que o Instituto Butantan como órgão complementar da Universidade de São Paulo está em contínuo relacionamento cultural com a mesma;

c) que a atual estrutura do Instituto abre perspectivas para um desenvolvimento maior na área de Educação para a Saúde na colaboração e formação de profissionais na área das Ciências Biológicas e Biomédicas, ampliando as possibilidades de recrutamento pela própria Instituições similares.

Nos seus 71 anos de existência, o Instituto Butantan que, administrativamente, é de âmbito estadual e, culturalmente, de âmbito internacional, transformou-se num patrimônio de incalculável valor para a educação e o ensino.

— Seus laboratórios especializados;

— seus técnicos superiores que, após uma formação universitária, praticamente "criaram" as suas especialidades.

— o desenvolvimento de pesquisas originais em áreas originais;

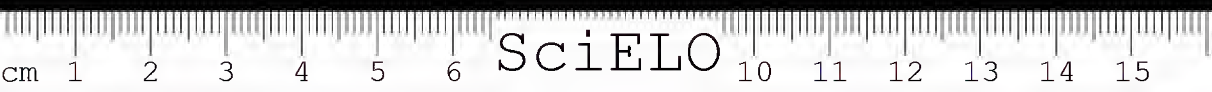


TABELA 3

Dados comparativos de atividades da Seção de Cursos do Instituto Butantan entre aos anos de 1969, 1970, 1971 e 1972

	Primário				Médio				Universitário				Totais			
	1969	1970	1971	1972	1969	1970	1971	1972	1969	1970	1971	1972	1969	1970	1971	1972
Número de aulas	2	10	9	5	51	68	63	77	37	16	37	47	107	130	110	129
Orientação para trabalhos escolares (número de alunos)	58	93	—	—	214	404	339	272	55	15	15	8	327	520	381	280

Observação: Número de pessoas abrangidas 2041 4081 3814 6357

Fonte: Relatórios anuais da Seção de Cursos do Instituto Butantan.

— a luta pela sobrevivência da pesquisa científica na área das ciências biológicas e de algumas ciências médicas básicas;
— a procura de um rendimento maior na área de produção, através do desenvolvimento e padronização de tecnologia avançada;
— a luta contra os entraves burocráticos e a falta de pessoal categorizado;
— as tentativas de aproximação com outras entidades culturais;
— a elaboração de teses de doutoramento pelos seus técnicos superiores;
— a promoção de estágios e treinamentos para alunos de nível médio e universitário;
— o funcionamento do Hospital Vital Brazil;
— a existência de um Museu especializado em animais peçonhentos.

são fatores determinantes que caracterizam a Instituição, tornando-a recurso inestimável a ser utilizado pela escola e pela comunidade.

Não só os recursos materiais e humanos altamente especializados, mas o espírito de luta em favor da ciência e do desenvolvimento, tornam a Instituição um manancial que transfere para grupos da comunidade nacional e internacional conhecimentos e um determinado tipo de dinâmica de trabalho.

Sendo uma instituição única na área das ciências biomédicas, apresenta aspectos unicos, abordagens únicas que são colocadas a serviço do conhecimento.

Através do desenvolvimento histórico-científico da Instituição, percebemos que as atividades didáticas que eram, no início, esparsas, difusas e assistemáticas, foram se transformando até culminarem numa Divisão de Extensão Cultural, que reune 3 seções: Cursos, Museu e Biblioteca, com funções de educação e ensino definidas.

Baseado nas necessidades:

1. da comunidade — que necessita esclarecimentos sobre Saúde Pública e algumas áreas da biologia e medicina;

2. das escolas de todos os graus — que não possuem elementos formados nas áreas tão especializadas do Instituto, para fornecerem orientação aos seus alunos;

3. da própria Instituição — no que se refere ao recrutamento de pessoal técnico superior e técnico de nível médio para o desenvolvimento de suas próprias atividades,

vem o Instituto, dentro das condições existentes, tentando organizar uma série de atividades didáticas de forma sistemática e estruturada, dependentes das solicitações que recebe dos diferentes grupos.

A recente Divisão de Extensão Cultural encontra-se apenas delineada em suas linhas mais gerais.

Sendo a Seção de Cursos encarregada do atendimento de alunos de todos os graus, da organização e coordenação de todas as atividades didáticas, do atendimento a visitas de especialistas, e sob nossa percepção profissional de pedagoga, orientadora educacional, educadora de saúde pública e especialista em Bacteriologia e Imunologia, a Instituição se nos apresenta como um cabedal riquíssimo que, mediante um planejamento educativo adequado junto à Direção Geral, poderia dar uma contribuição efetiva e inestimável à Secretaria de Negócios da Educação, à Universidade de São Paulo e demais instituições educacionais no sentido do aproveitamento desses recursos.

A tomada de consciência dos recursos existentes acrescida ao levantamento e análise dos mesmos, serviram de subsídio para a elaboração de um projeto que objetiva a definição, ordenação e desenvolvimento de uma área de educação no Instituto Butantan.

Esperamos que a reflexão e o projeto estimulem instituições similares a colocarem a serviço da comunidade diretamente, ou através da escola, seus recursos didáticos.

Não esquecendo que a educação e o ensino devem ser integrados e integradores, o projeto refere-se especialmente às de Saúde, uma vez que a Instituição desenvolve seus trabalhos nessas áreas.

5. IMPORTÂNCIA DO APROVEITAMENTO DOS RECURSOS EDUCACIONAIS DO INSTITUTO BUTANTAN PELA COMUNIDADE

No caso do Instituto Butantan, os recursos a serem aproveitados pela comunidade seriam, além do Hospital e da produção de imunoterápicos, a Educação para Saúde e a formação profissional ou complementar em algumas ciências biológicas e médicas.

Sendo uma instituição com funções diversificadas, o Instituto realiza atividades de Saúde Pública e de pesquisa. As atividades de Saúde Pública são realizadas através do atendimento à população feito pelo Hospital Vital Brasil e na produção de imunoterápicos. As pesquisas realizadas constituem forma de atendimento mediato à Saúde Pública.

Através de suas atividades, o Butantan oferece condições para implantar, organizar, coordenar ou colaborar com outras instituições em programas de Educação para a Saúde e em formação ou complementação nas ciências biológicas e médicas.

Ao nível de informação e divulgação para todos os grupos da comunidade, já conta com um Museu especializado em animais peçonhentos que recebe a visita diária de brasileiros e estrangeiros, constituindo verdadeira atração turística. Faz parte de todos os programas das companhias de turismo de São Paulo uma visita ao Instituto Butantan. O Museu contém informações a respeito da biologia de serpentes, aranhas e escorpiões, além de instruções sobre a captura desses animais e tratamento em casos de acidente. Conta ainda com a demonstração, ao vivo, de extração de veneno de serpentes.



Se os visitantes não se educam no sentido exato da palavra, são, pelo menos, despertados para os perigos que esses animais representam para o indivíduo ou para a população e são informados a respeito dos primeiros socorros a picados por animais peçonhentos.

Conta, ainda, dentro da Divisão de Extensão Cultural, com o atendimento didático e com a biblioteca biomédica.

Os temas mais solicitados para aulas são sobre suas especialidades: vacinas e soros, animais peçonhentos, preparação de soros antipeçonhentos.

O Hospital Vital Brazil também fornece elementos para a Educação em Saúde, uma vez que seus médicos e enfermeiras são especializados no atendimento a acidentados por animais venenosos.

Logo, o Instituto Butantan tem condições para colaborar na área educativa tanto na formação geral como na profissional.

Como os recursos educativos do Instituto Butantan poderiam ser aproveitados pela população escolar do 1.º e 2.º graus?

Se a Educação em Saúde para o *1.º grau* objetiva a formação de atitudes em relação à saúde e a formação de hábitos sadios; o conhecimento de condições sanitariais do lar, da escola; o reconhecimento do valor da ação preventiva das vacinas; a prevenção de acidentes e os socorros de urgência, o Instituto Butantan poderia colocar à disposição de alunos, professores e técnicos ligados à educação os seguintes recursos:

1. tradução dos objetivos da instituição como patrimônio científico-cultural da comunidade;

2. *aulas* sobre:

   — vacinas, sua importância e programas de vacinação;
   — prevenção de acidentes sobre animais peçonhentos;
   — conhecimentos sobre a biologia de serpentes, aranhas e escorpiões;
   — reconhecimento dos animais venenosos;
   — primeiros socorros a acidentados por animais venenosos;

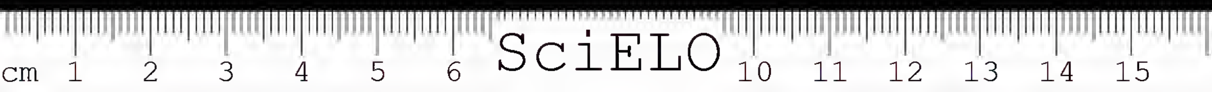
3. material didático ilustrativo dos temas citados;

4. visitas ao museu e serpentários acompanhadas por guias especializados;

5. orientação para trabalhos escolares a respeito dos programas de saúde e sobre animais peçonhentos.

Sendo o *2.º grau* profissionalizante, além da formação de atitude e adoção de comportamentos relativos à saúde, as atividades que o Instituto Butantan poderia desenvolver para grupos de alunos, professores e técnicos desse grau seriam:

1. tradução dos objetivos da instituição em termos de patrimônio científico da comunidade e das possibilidades de estágio e treinamento nas áreas aqui desenvolvidas, bem como mercado de trabalho para profissionais formados na área de ciências biológicas e biomédicas;



2. aulas sobre saúde pública, programa de imunização em massa, etc.;
3. aulas sobre as áreas da Biologia e Medicina desenvolvidas nas instituição;

   Por ex.: Bacteriologia e Imunologia
   Genética Animal e Humana
   Animais Peçonhentos
   Microscopia Eletrônica
   Farmacologia e Bioquímica;

4. treinamentos para reconhecimento de aptidões e interesses nas áreas da instituição;
5. estágios para o conhecimento do método de pesquisa no trabalho e para abertura de opção profissional;
6. orientação para trabalhos escolares: pesquisas nas áreas de saúde e ciências biológicas e biomédicas, feiras de ciências;
7. montagem de aulas e material audiovisual.

Na reforma atual do ensino onde o aluno escolhe entre as áreas de artes, letras, ciências exatas, ciências humanas, educação ou ciências biológicas, o Instituto Butantan conta com recursos educacionais para fornecer, através de planejamento e de entrosamento com a rede escolar estadual e municipal e das escolas particulares, atividades didáticas complementares na área de ciências biológicas. A Lei n.º 5692/71, prevê no seu artigo 3.º do Capítulo I, o entrosamento e a "intercomplementaridade dos estabelecimentos de ensino entre si ou com outras instituições sociais..." bem como "...a organização de centros interescolares...".

O maior aproveitamento dos recursos didáticos da Instituição pelos alunos do 2.º grau se justifica principalmente pelo seu objeto profissionalizante.

A área das ciências biomédicas é, talvez, a que oferece um espectro maior de disciplinas e conseqüentemente será a que formará maior número de novas profissões.

Neste grau, além da contribuição para a formação de comportamentos em relação à Saúde, a integração do aluno no seu meio social através do conhecimento das instituições de sua comunidade, o Instituto Butantan, poderia através de seu atendimento didático, fornecer importantes dados para uma abertura profissional na área das ciências biomédicas.

Não caberia à Instituição realizar a orientação profissional desses alunos mas, por meio de convênios com escolas de nível médio, forneceria aos alunos subsídios para a orientação vocacional. O aluno teria a oportunidade de conhecer para ter condições de optar conscientemente. É evidente que essas considerações se estendem a instituições de outras áreas. No caso do Instituto, se referem à Saúde e às ciências biológicas e médicas.



Por meio de estágios na Instituição, além dos subsídios para uma decisão profissional os alunos se iniciariam no aprendizado do método de pesquisa científica.

Ao *nível universitário*, a educação para a Saúde poderia e deveria constituir-se uma disciplina autônoma.

Supondo-se que comportamentos em relação à saúde já tenham sido adotados, o aluno neste nível deverá ser desperto para a conservação e promoção da sua saúde e principalmente da saúde da comunidade a qual ele pertence.

Na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo já há cursos de graduação para graduados em Saúde Pública, que tendem a ser aprovados como cursos de especialização.

Na graduação não há disciplinas ligadas diretamente à Saúde Pública. Talvez diante das Reformas do 1.º e 2.º gráu, mais a Reforma Universitária tome consciência da importância do desenvolvimento para a Saúde como ensino sistemático ao nível da graduação universitária.

O Projeto Rondon (1972), que visa a integração do estudante universitário nos problemas brasileiros, desenvolve a área de saúde, mas no elenco de disciplinas das faculdades e institutos universitários não se insere a saúde como estudo sistemático.

O Instituto Butantan procura colaborar em projetos desse tipo, embora seja de nossa opinião que os alunos deveriam receber uma carga horária constante do currículo de graduação sobre Saúde e Saúde Pública.

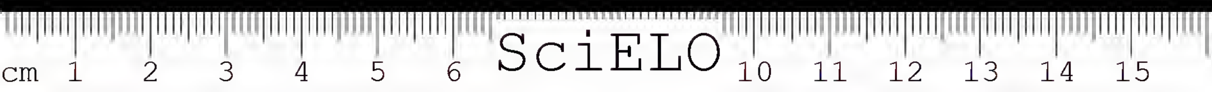
Em relação à formação profissional na área das ciências biológicas e médicas, consideramos que o Instituto Butantan oferece grandes possibilidades de colaborar através de uma sistematização de suas atividades didáticas.

Por um lado, sendo um instituto de pesquisa, suas atividades didáticas são, por assim dizer, "viezadas" pelo espírito de pesquisa, pois os professores que ministram aulas e orientam treinamentos, que promovem estágios e atendem visitas organizadas pela seção de cursos, são todos cientistas e pesquisadores e no momento em que estão realizando suas atividades didáticas, filtram aos grupos de alunos o espírito, a mentalidade de pesquisador.

Quando um grupo de estudantes universitários recebe qualquer tipo de atividade didática recebe ao mesmo tempo um enfoque diferente sobre os conhecimentos ministrados.

O desenvolvimento do espírito de pesquisa científica leva indiretamente ao desenvolvimento da criatividade dos indivíduos. Consideramos de máxima importância esta reflexão, pois fazer pesquisa se aprende pesquisando. Não nos parece factível a realização de cursos para formação de pesquisadores, se esses não trabalharem efetivamente em ambiente de pesquisa.

Se a formação do pós-graduado pretende levar à formação do pesquisador, já na graduação o aluno deverá ter elementos para julgar a constituição do trabalho de pesquisa científica.



Outro aspecto é o da possibilidade que a Instituição tem de fornecer matérias optativas para a Universidade de São Paulo ou outras universidades ou escolas superiores dentro da área de sua especialização.

Na Universidade de São Paulo, existem dois Institutos, o de Biociências e o de Biomédicas, cujas programações já analisamos anteriormente e que se beneficiariam, através de convênios, com a ministração de matérias optativas por instituições como o Instituto Butantan. Aliás, em 1970 já foram realizados no Instituto Butantan dois cursos que constituiram matérias optativas para o Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Foram ministradas duas disciplinas optativas, Herpetologia e Artropodos Peçonhentos aos alunos do 1.º ano do curso de Ciências Biológicas. Foi também realizado em 1971, curso de Bioquímica de Enzimas Proteolíticos para alunos do curso de Ciências Biomédicas da Escola Paulista de Medicina.

No caso de atendimento didático a alunos de nível universitário, os recursos do Instituto Butantan poderiam ser realizados através de:

1. Matérias optativas derivadas das seguintes grandes áreas:

   A) Microbiologia e Imunologia
   Bacteriologia e Virologia básica e aplicada em Tecnologia de produtos biológicos.

   B) Biologia
   Zoologia: ofídios e artrópodos
   Parasitologia
   Genética.

   C) Farmacologia e Bioquímica (básica e aplicada em métodos de pesquisa científica em venenos animais).

   D) Microscopia Eletrônica
   Básica
   Desenvolvimentos de processos.

   E) Química
   Tecnologia de produtos
   Controle de produtos.

   F) Patologia
   De venenos animais.

Dessas grandes áreas poderiam ser inferidas disciplinas mais especializadas.

Existem aspectos dessas grandes áreas que são desenvolvidas principalmente no Instituto Butantan.

Por exemplo no caso do Instituto de Ciências Biomédicas há em seus programas duas disciplinas: Artropodologia e Zoologia Médica de Vertebrados venenosos, as quais seriam altamente beneficiadas pelos recursos do Instituto Butantan.



2. Cursos de férias para universitários a respeito das especialidades da Instituição.

Esses cursos, sendo de extensão ou complementação universitária, visam a informação especializada em determinadas áreas.

3. Estágios nos laboratórios especializados, com compromisso de participação, tanto em trabalhos de rotina, como nos de pesquisa, exigindo-se relatórios para obtenção de certificado.
4. Treinamento nas áreas de prevenção a acidentes por animais peçonhentos em casos de excursões de Biologia, Geologia, etc.
5. Aulas sobre tradução dos objetivos e mercado de trabalho que a Instituição oferece.

O mercado de trabalho oferecido pode ser deduzido a partir de seu quadro de profissionais técnicos superiores.

Num total de 83 técnicos, até outubro de 1972, o Instituto Butantan possui:

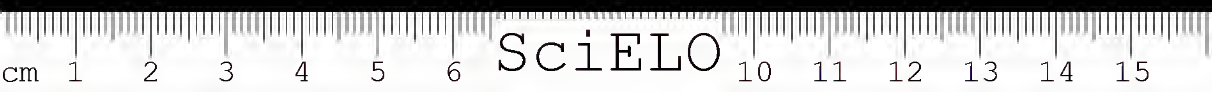
Médicos	19
Biólogos	21
Farmacêuticos-bioquímicos ou Farmacêuticos	24
Veterinários	8
Químicos	7
Advogados	2
Bibliotecários	1
Educadores	1
Engenheiro Químico	1

6. Visitas aos laboratórios especializados.

Em se tratando do nível de pós-graduação, tema ainda tão discutido e discutível em nossa universidade, lembramos os objetivos básicos da mesma, colocados pelos membros do Conselho Federal de Educação no parecer n.º 977/65 C.E.S.U., aprovado em 3/12/1965:

"O seu objetivo imediato é, sem dúvida, proporcionar ao estudante aprofundamento do saber que lhe permita alcançar elevado padrão de competência científica ou técnico-profissional impossível de adquirir no âmbito da graduação".

"... a pós-graduação tem por fim oferecer... o ambiente e os recursos adequados para que se realize a livre investigação científica e onde possa afirmar-se a gratuidade criadora...".



Ainda no parecer 977/65 (1965) o Aviso Ministerial aponta, "... em síntese os três motivos fundamentais que exigem, de imediato, a instauração do sistema de cursos pós-graduados:

1. formar professorado competente que possa atender à expansão quantitativa de nosso ensino superior, garantindo, ao mesmo tempo, a elevação dos atuais níveis de qualidade;
2. estimular o desenvolvimento da pesquisa científica por meio da preparação adequada de pesquisadores;
3. assegurar o treinamento eficaz de técnicos e trabalhadores intelectuais do mais alto padrão para fazer face às necessidades de desenvolvimento nacional em todos os setores."

No Instituto Butantan estão sendo organizados os cursos de pós-graduação.

Se o trabalho de pesquisa for sistematizado através de cursos de pós-graduação e de modo a levar o indivíduo a realizar um trabalho efetivo e definido que futuramente poderia constituir-se numa tese de mestrado ou doutoramento, haveria as seguintes vantagens:

a) colaboração para a comunidade na formação de pesquisadores na área de ciências biológicas e biomédicas;

b) recrutamento de pessoal especializado para a própria Instituição ou instituições similares;

c) a relevância no sentido do trabalho científico para os elementos da própria Instituição que, não tendo perspectivas altas quanto ao salário, teriam perspectivas definidas em relação ao auto desenvolvimento e à realização de uma carreira científica. A própria Instituição comporta uma geração nova carente de formação sistemática e estruturada ao nível de pós-graduação;

d) o benefício decorrente (embora a longo prazo) para o desenvolvimento científico da Instituição e da área. Não só desenvolvimento como aceleração da pesquisa.

Outro aspecto é o de ministrar cursos que sirvam de créditos a cursos de pós-graduação da área.

A reversão de benefício para a própria Instituição ou similares é de valor indiscutível.

Quanto ao âmbito da comunidade, podemos distinguir três aspectos:

I — o trabalho educativo direto com a população.

II — o trabalho educativo através das empresas governamentais ou particulares, isto é, Serviços da Comunidade.

III — o trabalho educativo através da Escola.

I — Quanto ao trabalho educativo realizado diretamente com a população, o Instituto não pode prever grande expansão.

Este trabalho realiza-se, como já relatamos, através do museu, que está em fase de remodelação, e do Hospital Vital Brazil.

Qualquer elemento da comunidade visitando o Museu ou sendo atendido pelo Hospital recebe uma série de informações sobre Saúde, Biologia e Medicina.

Não podemos considerar essas atividades como um fator de desenvolvimento comunitário, uma vez que elas são atualmente organizadas sem uma participação consciente da comunidade.

Numa revisão geral sobre comunicação, informação e educação, distinguindo-se métodos de comunicação, a informação como fase da educaço, esses recursos poderiam ser grandemente reformulados para um efetivo rendimento no processo educativo. Na medida em que se conscientizar, na Instituição, que o Museu pode ser um recurso didático para a educação e não apenas uma fonte de informação e divulgação, o rendimento em termos de formação de atitudes e comportamentos deverá ser grandemente alterado.

II — A participação da Instituição em programas educativos da Secretaria de Estado da Saúde e da Secretaria dos Negócios da Educação e de outras entidades governamentais ou particulares levaria a um rendimento maior das atividades didáticas existentes.

O atendimento é feito para determinados grupos, indo ao encontro das necessidades daquele grupo. Em termos de aprendizagem qualitativa é válido mas em termos de rendimento quantitativo haveria uma mudança considerável, caso fôsse sistematizado.

A sistematização das atividades do Instituto Butantan e a colocação de um programa à disposição dessas instituições resultariam em real aproveitamento de seus recursos por parte da comunidade.

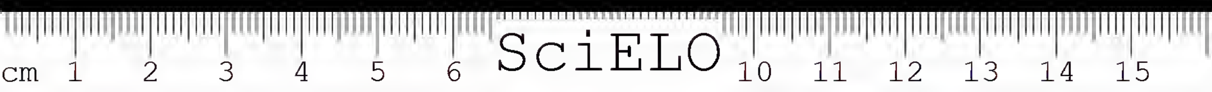
III — Distinguimos a escola como uma terceira possibilidade, pois o atendimento tem sido feito através de solicitações de unidades escolares públicas ou particulares de todos os níveis.

Considerando-se que os estudantes de todos os níveis são duplicadores de conhecimentos para a Comunidade, a escola se torna elemento para o desenvolvimento comunitário.

Quanto ao Desenvolvimento Comunitário propriamente dito, o Instituto é dotado de recursos inestimáveis para a área de Saúde Pública.

Em nossa opinião o desenvolvimento comunitário como processo dirigido encontra-se ainda em fase embrionária. Há algumas experiências isoladas realizadas por determinados grupos. Este fato não invalida a colocação das possibilidades da colaboração do Instituto Butantan no trabalho comunitário na área de Saúde.

Sendo Instituição ligada à Saúde e órgão complementar da Universidade de São Paulo, o Instituto Butantan poderá exercer atividades comunitárias em associação com a própria Universidade na área de saúde pública.



6. PROJETO DE DESENVOLVIMENTO E AMPLIAÇÃO DAS ATIVIDADES DIDÁTICAS DO INSTITUTO BUTANTAN

Justificativa

Considerando:

1. a necessidade de atendimento à população em geral, e especialmente a escolar, no que concerne às especialidades do Instituto, quais sejam:

   Prevenção em relação a animais peçonhentos
   Imunização
   Atendimento hospitalar

2. a necessidade de formação de novos técnicos ou da melhoria dos existentes para atuarem no setor saúde, de forma imediata — tecnologia de produtos, ou de forma mediata, pesquisa biológica e médica, através de treinamentos e cursos de vários níveis;
3. a grande especialização e a diversificação de áreas do Instituto;
4. a necessidade da existência de um material didático catalogado relativo às atividades nas diversas áreas;
5. a necessidade da formação de pessoal adequado para atendimento ao público nacional e internacional;
6. a necessidade de supervisão de toda atividade educacional realizada no Instituto;
7. a necessidade de uma avaliação constante de métodos e técnicas empregadas na área educativa;
8. ampliação e reestruturação da rede escolar do ensino médio e o conseqüente aumento da procura por parte de estudantes do 1.º e 2.º graus;
9. a reestruturação da Universidade de São Paulo e o afluxo de estudantes para estágios e cursos correspondentes a matérias optativas;
10. a constante solicitação por parte de grupos de militares, enfermeiros e médicos que buscam informações especializadas a respeito de Primeiros Socorros a picados por animais peçonhentos e produção de imunoterápicos;
11. a necessidade de integração com instituições similares e complementares para evitar redundância e obter maior rendimento.

Nosso principal interesse é a realização de um levantamento das possibilidades do Instituto Butantan na área da educação.



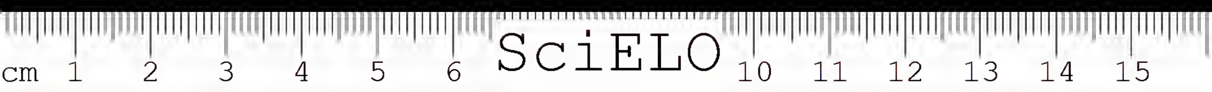
Justificamos este projeto lembrando que não se pretende transformar o Instituto Butantan em uma escola, mas aproveitar os recursos existentes através de uma sistematização dos mesmos.

Objetivo geral

Desenvolver e ampliar atividades de educação e ensino no Instituto Butantan utilizando os recursos de suas áreas de atuação.

Objetivos específicos ou parciais

1. sistematização das atividades educativas da Instituição;
2. assessoria em Educação;
3. desenvolvimento de pesquisas no campo de educação, de acordo com as necessidades sugeridas no decorrer das atividades da Seção de Cursos;
4. integração com instituições similares ou complementares;
5. atualização constante através de contátos permanentes com instituições ligadas à educação e ao ensino;
6. participação em congressos ligados à Ciência e à Educação;
7. organização, implantação e coordenação de cursos regulares de diferentes níveis ligados aos seguintes temas básicos:
   - saúde pública
   - biociências e ciências biomédicos desenvolvidas no Instituto Butantan
   - venenos animais
   - animais peçonhentos
   - tecnologia de produtos biológicos;
8. coordenação de treinamento em serviço para os funcionários do Instituto, nos vários níveis e nas diferentes carreiras a fim de homogeneizar e elevar o padrão dos mesmos;
9. treinamento especializado em animais peçonhentos para trabalho de campo de diferentes profissionais: militares, guardas florestais, geólogos, enfermeiros, médicos, (escoteiros), etc;
10. organização e coordenação de cursos intensivos de férias para estudantes universitários;
11. treinamento de guias para o Museu do Instituto Butantan, para o atendimento de visitas nacionais e internacionais;



12. coordenação de estágios a serem realizados nos diferentes Laboratórios do Instituto para professores e estudantes de nível universitário e pós-graduado;
13. orientação para trabalhos escolares de alunos e professores dos diferentes níveis;
14. organização de material didático para uso da Seção de Cursos e empréstimo aos técnicos superiores no atendimento didático;
15. organização da divulgação sistemática a respeito do atendimento didático do Instituto.

Período previsto: Plano quadrienal para a programação dos objetivos.

Recursos humanos e materiais

Os recursos humanos disponíveis são os próprios especialistas do Instituto que ministram aulas, orientam estágios e treinamentos e funcionários da Divisão de Extensão Cultural. Os recursos materiais e a ampliação dos recursos humanos deverão ser previstos no decorrer da execução do projeto.

Identificação dos comportamentos de entrada

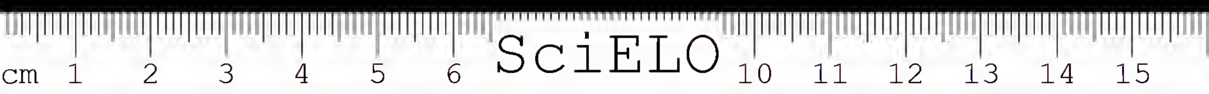
Válidos para todos os objetivos específicos ou parciais propostos.

I — *Caracterização da população a ser atendida*

a) Direção Geral do Instituto Butantan
b) Conselho Superior do Instituto Butantan
c) especialistas do Instituto Butantan
d) funcionários dos níveis e carreiras existentes no Instituto Butantan
e) professores e coordenadores de cursos de pós-graduação
f) professores universitários
g) professores de 1.º e 2.º graus
h) técnicos com atividades ligadas à educação
i) alunos dos diferentes níveis
j) público em geral.

II — *Caracterização dos recursos da Instituição*

a) pesquisadores especializados nas áreas de Saúde, Biociência e Ciências Biomédicas
b) laboratórios especializados para aulas, treinamentos e estágios
c) museu especializado
d) biblioteca biomédica
e) hospital especializado
f) Seção de Cursos.



Objetivos específicos	Objetivos instrucionais ou operacionais	Conteúdo	Estratégia	Indicadores de avaliação
1. Sistematização das atividades educativas da instituição.	1.1. Sistematizar as atividades educativas existentes. 1.2. Arrolar as áreas que terão prioridade no trabalho educativo. 1.3. Estabelecer um planejamento para as atividades educativas.	1.1. Planejamento geral da instituição. 1.2. Características de cada área.	1.1. Contáto com a diretoria geral. 1.2. Levantamento de dados à respeito de recursos materiais e humanos à disposição da seção de cursos. 1.3. Levantamento dos recursos materiais, humanos e técnicos de cada área.	1.1. Resultado da eficácia da sistemática utilizada. 1.2. Análise dos dados diagnósticos levantados para situar o momento e o grau em que se colocam as atividades educativas.
2. Assessoria em Educação.	2.1. Assessorar o Conselho Superior, Direção Geral e Técnicos Superiores do Instituto Butantan.	2.1. Assessoria em assuntos ligados à educação.	2.1. Participação no planejamento geral das atividades da Instituição. 2.2. Atendimento à solicitações do Conselho Superior, Direção Geral e demais técnicos superiores do Instituto Butantan referentes à área educativa.	2.1. Número de participações em reuniões do Conselho Superior, da Direção Geral e dos Técnicos Superiores. 2.2. Número de sugestões apresentadas.

Objetivos específicos	Objetivos instrucionais ou operacionais	Conteúdo	Estratégia	Indicadores de avaliação
3. Desenvolvimento de pesquisas no campo da educação, de acordo com as necessidades sugeridas no decorrer das atividades da Seção de Cursos.	3.1. Estabelecer pesquisas sistemáticas em todas as etapas do desenvolvimento das atividades da Seção de Cursos.	3.1. Metodologia da pesquisa científica em educação.	3.1. Elaboração de projetos de pesquisa em educação e ensino. 3.2. Treinamento de pessoal para desenvolvimento das pesquisas em educação e ensino. 3.3. Execução do projeto de pesquisa. 3.4. Publicação das pesquisas realizadas.	3.1. Número de projetos elaborados. 3.2. Número de pesquisas elaboradas. 3.3. Número de pesquisas publicadas.
4. Integração com instituições similares ou complementares.	4.1. Utilizar recursos de instituições similares ou complementares. 4.2. Oferecer recursos a instituições similares ou complementares.	4.1. Recursos das instituições similares ou complementares. 4.2. Recursos do Instituto Butantan passíveis de serem aproveitados por instituições similares ou complementares.	4.1. Cadastramento das instituições similares ou complementares. 4.2. Estabelecimento de convênios com instituições como SESP, CENAFOR, etc.	4.1. Número de instituições cadastradas. 4.2. Número de convênios com instituições similares ou complementares.

Objetivos específicos	Objetivos instrucionais ou operacionais	Conteúdo	Estratégia	Indicadores de avaliação
5. Atualização constante através de contatos permanentes com instituições ligadas à educação e ensino.	5.1. Atualizar-se em relação ao ensino. 5.2. Estabelecer contato com instituições ligadas à educação e ao ensino.	5.1. Fontes para a atualização: Legislação Programas	5.1. Cadastramento das fontes de consulta. 4.2. Correspondência regular com universidades e demais entidades de ensino. 5.3. Organização de mini-biblioteca especializada em educação e ensino para a Seção de Cursos.	5.1. Correspondência enviada e recebida. 5.2. Acêrvo conseguido pela mini-biblioteca. 5.3. Existência de intercâmbio com outras instituições.
6. Participação em Congressos ligados à Ciência e Educação.	6.1. Participar de Congressos ligados à Ciência e Educação.	6.1. Congressos, Encontros, Seminários nas áreas de Ciências ligadas à Biologia e Medicina e áreas de Educação.	6.1. Comparecimento em Congressos, Encontros, Seminários, ligados à Ciência e Educação. 6.2. Apresentação de trabalhos ligados à área da Saúde e da Educação.	6.1. Número de participações em congressos. 6.2. Número de trabalhos apresentados.

Objetivos específicos	Objetivos instrucionais ou operacionais	Conteúdo	Estratégia	Indicadores de avaliação
7. Organização, implantação e coordenação de cursos regulares de diferentes níveis ligados aos seguintes temas básicos. — saúde pública — biocências, ciências biomédicas, desenvolvidas no no Instituto Butantan — venenos animais — animais peçonhentos — tecnologia de produtos biológicos.	7.1. Organizar cursos regulares correspondentes a: a — pós-graduação nas áreas de especialização do Instituto Butantan. b — matérias optativas de cursos de graduação oferecidos a U.S.P. c — cursos de especialização. d — cursos de aperfeiçoamento. e — cursos de extensão cultural.	7.1. Programação de diferentes cursos nas áreas desenvolvidas pelo Instituto.	7.1. Organização dos diferentes cursos. 7.2. Esquema de montagem da coordenação pedagógica.	7.1. Número de cursos realizados. 7.2. Análise da demanda de instituições, professores e alunos em relação aos diferentes cursos. 7.3. Número de alunos matriculados nos diferentes cursos. 7.4. Número de alunos aprovados nos diferentes cursos. 7.5. Número de certificados expedidos nos diferentes cursos. 7.6. Número de teses de mestrado e doutorado realizadas no Instituto Butantan. 7.7. Eficácia de métodos e técnicas empregadas nos diferentes cursos. 7.8. Aprendizagem dos alunos.

Objetivos específicos	Objetivos instrucionais ou operacionais	Conteúdo	Estratégia	Indicadores de avaliação
8. Coordenação de treinamentos em serviço para os funcionários do Instituto, nos vários níveis e nas diferentes carreiras a fim de homogeneizar e elevar o padrão dos mesmos.	8.1. Identificar o grau de instrução de cada funcionário do Instituto Butantan. 8.2. Identificar as carreiras funcionais existentes no Instituto Butantan. 8.3. Identificar as exigências por carreira funcional. 8.4. Relacionar as exigências por carreira funcional com o grau de instrução de cada funcionário. 8.5. Treinar em serviço os funcionários das áreas técnica e administrativa da Instituição.	8.1. Carreiras e cargos existentes na Instituição. 8.2. Número de funcionários por cargo e carreira. 8.3. Exigências funcionais das atribuições de cada cargo c carreira.	8.1. Levantamento de dados à respeito do número de funcionários do Instituto Butantan, por cargo e carreira. 8.2. Levantamento de dados relativos às atribuições legais de cada cargo c carreira. 8.3. Estabelecimento de convênios com entidades ligadas à treinamento para funções administrativas. Ex.: SENAC, DAPE, etc.	8.1. Número de funcionários das áreas técnica e administrativa que receberam treinamento em serviço. 8.2. Número de funcionários das áreas técnica e administrativa que frequentaram cursos. 8.3. Mudança no rendimento dos funcionários de diferentes carreiras e funções.
9. Treinamento especializado em animais peçonhentos para trabalhos de campo de diferentes profissionais: militares, guardas florestais, geólogos, enfermeiros, médicos (escoteiros), etc.	9.1. Treinar profissionais que em seu trabalho de campo necessitem conhecer e capturar animais peçonhentos, bem como realizar primeiros socorros a picados por esses animais.	9.1. Informações à respeito de animais peçonhentos: captura, conhecimento e reconhecimento. 9.2. Informações à respeito de primeiros soeorros a picados por animais peçonhentos.	9.1. Curso curto teórico prático. 9.2. Visita aos laboratórios especializados e ao Hospital Vital Brazil.	9.1. Número de pessoas atendidas, por profissão. 9.2. Aprendizagem dos alunos, por profissão. 9.3. Eficáeia dos métodos e técnicas empregadas no treinamento.

Objetivos específicos	Objetivos instrucionais ou operacionais	Conteúdo	Estratégia	Indicadores de avaliação
10. Organização e coordenação de cursos intensivos de férias para estudantes universitários.	10.1. Organizar e coordenar cursos intensivos de férias para estudantes universitários.	10.1. Programação dos diferentes cursos.	10.1. Pesquisa nos meios universitários a respeito do interesse nas áreas cultivadas no Instituto Butantan. 10.2. Estabelecimento de áreas prioritárias nas quais seriam montados os cursos. 10.3. Divulgação a respeito da montagem dos cursos nos meios universitários.	10.1. Número de cursos organizados por área. 10.2. Número de alunos matriculados. 10.3. Número de alunos aprovados. 10.4. Eficiência de métodos e técnicas empregadas nos diferentes cursos. 10.5. Aprendizagem dos alunos dos diferentes cursos.
11. Treinamento para guias do Museu do Instituto Butantan para atendimento de visitas nacionais e internacionais.	11.1. Treinar candidatos para Guias do Museu Especializado do Instituto Butantan.	11.1. Atividades desenvolvidas pela Instituição. 11.2. Técnicas de comunicação audiovisual. 11.3. Estabelecimento de roteiro de atendimento a visitas.	11.1. Seleção de candidatos que falem fluentemente mais uma língua além do português. 11.2. Curso teórico acrescido de estágio nas diferentes Divisões do Instituto.	11.1. Desempenho satisfatório dos guias. 11.2. Eficácia do roteiro de atendimento. 11.3. Número de treinamentos. 11.4. Número de treinados. 11.5. Número de aproveitamento desses alunos pelo Instituto Butantan. 11.6. Eficiência dos métodos e técnicas empregadas.

Objetivos específicos	Objetivos instrucionais ou operacionais	Conteúdo	Estratégia	Indicadores de avaliação
12.1 Coordenação de estágios a serem realizados nos diferentes laboratórios do Instituto Butantan para professores ou estudantes em níveis universitário e pós-graduado.	12.1. Capacitar elementos a desenvolverem atividades profissionais em caráter especializado e aprofundado em laboratórios de áreas das especialidades no Instituto.	12.1. Roteiros de estágios conforme a especialidade. 12.2. Baseado nas necessidades dos estagiários.	12.1. Estágio nos laboratórios especializados. 12.2. Organização de roteiros que incluem os vários laboratórios.	12.1. Número de estagiários. 12.2. Número de escolas superiores atendidas. 12.3. Eficiência dos roteiros estabelecidos.
13. Orientação para trabalhos escolares de alunos e professores dos diferentes níveis.	13.1. Traduzir a Instituição como recurso da comunidade para a Saúde Pública. 13.2. Traduzir a Instituição como o recurso da comunidade para pesquisas nas áreas de ciências biomédicas e biociências.	13.1. Objetivos da Instituição. 13.2. Atividades da Instituição. 13.3. Saúde Pública.	13.1. Entrevistas. 13.2. Reunião de grupo. 13.3. Aulas teóricas. 13.4. Organização de roteiro de visitas.	13.1. Número de colégios atendidos — classificação por nível. 13.2. Número de professores atendidos. 13.3. Número de alunos atendidos 13.4. Eficiência de métodos e técnicas empregadas.

Objetivos específicos	Objetivos instrucionais ou operacionais	Conteúdo	Estratégia	Indicadores de avaliação
14. Organização de material didático para uso da Seção de Cursos e empréstimo aos Técnicos Superiores no atendimento didático.	14.1 Planejar, selecionar, confeccionar, utilizar, avaliar materiais audiovisuais para utilização nas diferentes modalidades didáticas do Instituto.	14.1. Informações sobre recursos audiovisuais, comunicação, fundamentação psicopedagógica, comunicação visual; equipamento para uso dos recursos.	14.1. Orientação sobre o conteúdo do material audiovisual. 14.2. Intercâmbio com instituições especializadas. 14.3. Levantamento de materiais audiovisuais existentes em outras instituições para empréstimo. 14.4. Organização de roteiro de diapositivos ou diafilmes referentes às diferentes áreas do I.B. 14.5. Organização de roteiros para filmes. 14.6. Organização e supervisão da confecção de cartazes, folhetos e postilas. 14.7. Catalogação do material.	14.1. Número de filmes, diapositivos, diafilmes, folhetos, postilas e outros materiais elaborados por assunto e por tipo de público.

Objetivos específicos	Objetivos instrucionais ou operacionais	Conteúdo	Estratégia	Indicadores de avaliação
15. Organização da divulgação sistemática a respeito do atendimento didático do Instituto.	15.1. Planejar e executar a divulgação sistemática das atividades didáticas do Instituto Butantan a fim de atingir os grupos interessados.	15.1. Atividades didáticas passíveis de realização no Instituto Butantan.	15.1. Divulgação através de veículos de comunicação de massa, atendendo a calendário letivo. 15.2. Divulgação em publicações periódicas relacionadas a ensino. 15.3. Divulgação através de folhetos, cartazes e volantes.	15.1. Aumento da demanda (de todas as modalidades didáticas) por parte das escolas e público.

7. CONCLUSÕES

I — Os institutos de pesquisas da cidade de São Paulo desenvolvem, em maior ou menor escala, atividades didáticas.

II — O Instituto Butantan possui recursos didáticos especializados, no se refere às áreas de Saúde, Biologia e Medicina, que pode colocar a serviço da educação.

III — Mediante uma sistematização dos recursos didáticos do Instituto Butantan, a comunidade, através da escolha, poderá usufruir melhor desses recursos.

IV — O aproveitamento dos recursos do Instituto Butantan por Serviços de Educação levaria os escolares à maior integração no meio ambiente e no seu próprio processo educativo.

V — Os estágios oferecidos pela instituição e a orientação sistemática para estudantes de nível médio seriam úteis na escolha profissional desses alunos.

VI — A formação especializada que o Instituto Butantan poderá fornecer será um meio de recrutamento de mão de obra especializada para a própria Instituição e Instituições similares.

VII — A formação complementar, que a Instituição pode vir a fornecer, refletir-se-á na especialização de recursos humanos, para posterior influência no desenvolvimento da pesquisa científica na área das biociências e das ciências biomédicas.

VIII — O aproveitamento dos recursos pela comunidade seria uma reversão dos gastos que essa comunidade tem com a Instituição.

IX — O projeto apresentado poderá sugerir linhas de trabalho para outros institutos de pesquisa.

SUMMARY — Based on the State Legislation, the author studied the development of the Instituto Butantan from its foundation to the present structuration, giving emphasis to the didactic activities of the Institution.

Since these activities are closely related to the Public Health Service, Biological and Medical Sciences, a project has been proposed aiming at the different schooling levels, wellfounded on the Instituto Butantan's possibilities and on the new basical and directive law of educatiion.

The presented chart suggests lines of work for similar research institutes.

UNITERMS — Research Institute. Health Education. Professional training in Biomedical Sciences.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Leis, decretos, etc. Lei n.º 5.692 de 11/8/1971. Fixa diretrizes e bases para o ensino de 1.º e 2.º graus. *Lex Coletânea de Legislação — Legislação Federal e Marginália*, São Paulo, 35: 1114-1125, agôsto 1971.

BRASIL. Ministério da Educação e Cultura. Conselho Federal de Educação. Parecer n.º 977/65, aprovado em 3/12/1965. Definição dos cursos de pós-graduação. *Documenta*, Rio de Janeiro, 44: 67-88, 1965.

BRASIL. Ministério de Educação e Cultura. Escola Paulista de Medicina. Anuário: *Curso de Graduação em Ciências Biomédicas*. São Paulo, 1971.

BRASIL. Ministério do Interior. *Projeto Rondon: Histórico; Filosofia; Objetivos; Estrutura; FunRondon; Atuação*. Brasilia, Gráfica do Senado, 1972.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto n.º 878-A de 23/2/1901. Dá organização ao Instituto Serumtherápico em Butantan — a cargo da Diretoria do Serviço Sanitário. *Coleção das Leis e Decretos do Estado de São Paulo*, 51: 29, fev. 1901.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto n.º 3.876 de 11/7/1925. Reorganiza o Serviço Sanitário e repartições dependentes. *Coleção das Leis e Decretos do Estado de São Paulo*, 35: 470, jul. 1925.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto n.º 4.917 de 3/3/1931. Transforma a Secretaria de Estado dos Negócios do Interior em Secretaria Pública e dá outras providências. *Coleção das Leis e Decretos do Estado de São Paulo*, 41: 332, mar. 1931.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto n.º 4.941 de 21/3/1931. Reorganiza o Instituto Butantan. *Coleção das Leis e Decretos do Estado de São Paulo*, 41, 264, mar. 1931.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto nº 4.998 de 2/4/1931. Regulamenta o Decreto n.º 4.941, de 21/3/1931, que reorganiza o Instituto Butantan. *Coleção das Leis e Decretos do Estado de São Paulo*, 41: 439, abr. 1931.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto nº 6.283, de 25/1/1934. Cria a Universidade de São Paulo e dá outras providências. *Coleção das Leis e Decretos do Estado de São Paulo*, 44: 25, jan. 1934.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto n.º 9.247, de 17/6/1938. Cria o Departamento de Saúde do Estado, que fica subordinado diretamente à Secretaria de Estado dos Negócios da Educação e Saúde e extingue o Serviço Sanitário. *Coleção das Leis e Decretos do Estado de São Paulo*, 48: 112, jan. 1938.

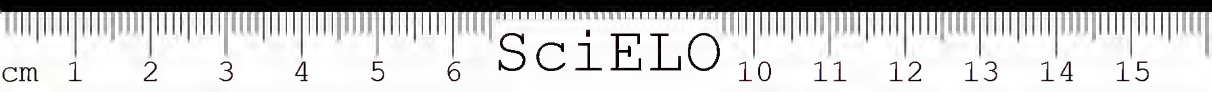
SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto n.º 9.393, de 5/8/1938. Organiza o Serviço de Laboratórios de Saúde Pública do Departamento de Saúde do Estado e dá outras providências. *Coleção das Leis e Decretos do Estado de São Paulo*, 58: 171, ago. 1938.

SÃO PAULO. Leis. decretos. etc. Decreto n.º 3.437, de 22/8/1938. Dá competência aos serviços de laboratórios de saúde pública, dependência do Departamento de Saúde do Estado, com sede no Instituto Butantan, 48: 255, ago. 1938.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto nº 12.787, de 30/6/1942. Subordina o Instituto Butantan diretamente à Secretaria de Educação e Saúde Pública. *Coleção das Leis e Decretos do Estado de São Paulo*, 52: 193, jun. 1942.

SÃO PAULO. Leis, decretos etc. Decreto nº 17.351 de 1/7/1947. Tranfere para a Secretaria de Estado dos Negócios da Saúde Pública e da Assistência Social, os serviços que menciona. *Coleção das Leis e Decretos do Estado de São Paulo*, 58. 36, *jul.* 1947.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto n.º 26.979, de 11/12/1956. Dispõe sobre a criação do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan. *Coleção das Leis e Decretos do Estado de São Paulo*, 66: 638, dez. 1956.



SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto nº 40.996, de 6/11/1962. Dispõe sobre a organização do Instituto Butantan da Secretaria de Estado dos Negócios da Saúde Pública e da Assistência Social e dá outras providências. *Coleção das Leis e Decretos do Estado de São Paulo*, **72**: 734, nov. 1962.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto n.º 50.404, de 23/9/1968. Dispõe sobre a organização do Instituto Butantan. *LEX- Legislação do Estado de São Paulo e da Prefeitura da Capital* **22**: 709, set. 1968.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto n.º 52182, de 16/7/1969. Dispõe sobre a organização da Secretaria de Estado da Saúde. *LEX — Legislação do Estado de São Paulo e da Prefeitura da Capital*, **23**: 371, jul. 1969.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto n.º 52214, de 24/7/1969. Regulamenta o Instituto Butantan e define legalmente as atribuições da Seção de Cursos. *LEX — Legislação do Estado de São Paulo e da Prefeitura da Capital*, **23**: 44, ául. 1969.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto n.º 15.094, de 11/10/7945. Reorganiza o Instituto Butantan como centro de pesquisa aplicada à medicina experimental e à fisiopatologia humana, diretamente subordinado à Secretaria de Educação e Saúde Pública. *Coleção das Leis e Decretos do Estado de São Paulo*, **55**: 201, out. 1945.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Lei n.º 5.151, de 7/1/1959. Cria o Conselho das Instituições de Pesquisa do Estado de São Paulo. *Coleção das Leis e Decretos do Estado de São Paulo*, **49**: 13, jan. 1959.

ANEXO

INSTITUTO BUTANTAN

SEÇÃO DE CURSOS

Trabalhos de pesquisa educacional realizados no eríodo compreendido entre: 1964-1972

1964 — Contribuição do Instituto Butantan para a formação de especialistas no campo da Biologia.

1965 — Cursos de divulgação do Instituto Butantan.

1966 — Metodologia dos cursos de formação de pesquisadores do Instituto Butantan.

1969 — Cursos de pós-graduação. Análise e tentativa de definição.

1970 — Evolução da atividade didática do Instituto Butantan.

1971 — Instituto Butantan: informação e educação sanitária.

1971 — Atividades do educador de saúde pública num instituto de pesquisa.

1971 — Delimitação da área de ação da Seção de Cursos do Instituto Butantan.

1971 — Projeto pilôto de treinamento em serviço para pessoal de saúde pública.

1971 — Aspectos educacionais de um programa de desenvolvimento no setor Saúde pública para a cidade de Cunha (em colaboração).

1971 — Carta sanitária da cidade de Vinhedo (em colaboração).

1972 — Comunidade e Saúde Pública.

Recebido para publicação em 23.VII.73.
Aceito para publicação em 01.VIII.73.



Mem. Inst. Butantan
37: 83-90, 1973

ESTUDO ELETROFORÉTICO EM "CELLOGEL" DE VENENOS DO GÊNERO *BOTHROPS*

MEDARDO SILES VILLARROEL *
RAYMUNDO ROLIM ROSA **
REYNALDO SCHWINDT FURLANETTO ***
FLÁVIO ZELANTE *

RESUMO — Os autores, realizando a eletroforese de seis venenos de serpentes do gênero *Bothrops* Wagler, 1824, sobre membrana de "Cellogel" verificaram que a metodologia aplicada propicia uma melhor separação dos componentes desses venenos em menor tempo de exposição do que as técnicas anteriormente utilizadas.

UNITERMOS — Eletroforese de venenos ofídicos sobre "cellogel"; eletroforese de venenos botrópicos.

INTRODUÇÃO

O estudo do ofidismo, entre nós, a partir dos trabalhos pioneiros de Brazil & Pestana (1909) vem merecendo, gradativamente, maiores atenções. Dentre as serpentes venenosas do Brasil, o gênero *Bothrops* é aquele responsável pelo maior número de acidentes. Rosenfeld (1969), atribui-lhe a responsabilidade de 90,8% do total dos acidentes ofídicos.

Tais observações contribuiram para despertar os nossos interesses para o estudo dos venenos botrópicos, principalmente em seus aspectos imunoquímicos. Tentativas a este respeito já têm sido realizadas, quer com a utilização de processos químicos, quer com a utilização de processos eletroforéticos.

Köenig (1937) demonstrara a possibilidade da separação eletroforética do veneno de *B. jararaca*. Seguiram-se os trabalhos de Polson et al (1946), Gonçalves & Polson (1947), Gonçalves (1948), Gonçalves & Vieira (1950). Esses autores utilizaram-se de papel de filtro, como suporte para a corrida eletroforética. Gonçalves S. Vieira (1950) loc. cit. obtiveram através desta técnica nove frações no veneno de *B. jararacussu*, quatro frações no veneno de *B. jararaca* e sete frações no veneno de *B. atrox*.

A partir dessa época, melhores técnicas de eletroforese foram introduzidas tais como a eletroforese em "Acetato da Celulose" (Afonso, 1961; Bartlett, 1963; Ritts, Jr. & Ondrick 1964) e, mais recentemente as técnicas que utilizam, como

* Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.
** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.
*** Professor Catedrático do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

Endereço para correspondência:
C.P. 4365, São Paulo, Brasil.

suporte, membranas de "Cellogel" Paget & Coustenoble, 1965-1966; Colfs & Verheyden, 1967).

Decidimos pois utilizar membranas de "Cellogel" como suporte, para a corrida eletroforética de venenos de seis espécies de serpentes do Gênero *Botrops* (*B. jararaca, B. alternatus, B. insularis, B. jararacussu, B. moojeni* e *B. cotiara*), procurando revelar se esta técnica poderia oferecer maiores vantagens comparando os resultados obtidos com aqueles encontrados pelos autores anteriormente citados.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho, utilizamo-nos dos mesmos materiais e métodos descritos por Siles Villarroel (1972).

Venenos ofídicos:

Os venenos ofídicos utilizados, fornecidos pelo Instituto Butantan, foram obtidos por extração manual de numerosas serpentes adultas, cristalizados por secagem a vácuo e mantidos a 0-4°C. Utilizamo-nos de venenos das seguintes espécies: *B. jararaca* (Wied, 1824), *B. alternatus* Duméril, Bibron et Duméril, 1854, *B, insularis Amaral* 1921), *B. jararacussu* Lacerda, 1884, *B. moojeni* Hoge, 1965* e *B. cotiara* (Gomes, 1913).

De cada veneno cristalizado, foram preparadas soluções a 0,5%, 1%, 2% e 4%, em solução fisiológica (NaCl a 0,85%) e distribuidas em frascos contendo 2 ml de cada solução, hermeticamente fechados e mantidos a temperatura de -25°C (Furlanetto, 1965). No momento do uso, as soluções eram descongeladas e os excedentes desprezados.

Materiais e aparelhos utilizados:

a) retificador de corrente, munido de miliamperímetro e voltímetro, regulável de 0 a 250 mA e de 0 a 1000 volts;
b) cuba equipada com suporte, para eletroforese sobre "Cellogel", marca Chemetron;
c) aplicador, com capacidade de 0,003 ml, marca Chemetron;
d) tiras de "Cellogel", de 25 x 140 mm, marca Chemetron;
e) solução tampão com pH 8,8 e fôrça iônica 0,06;
f) solução corante de amido Schwartz a 0,5%;

* A *Bothrops moojeni* Hoge, 1965, era, até essa data, classificada como *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758).



g) solução descorante a base de metanol e ácido acético;

h) desidratante metanol puro;

i) solução de transparentização a base de metanol, ácido acético e glicerina.

Modelo experimental:

Realizamos numerosas provas preliminares a fim de determinar as melhores condições de contração das soluções dos venenos e de tempo de exposição, com a finalidade de obter uma melhor separação das várias frações constituintes dos venenos botrópicos. Conseguimos assim estabelecer as seguintes condições que oferecem melhores resultados:

a) 4% de concentração das soluções de veneno;

b) corrida eletroforética por 90 minutos e a 200 volts.

Após a eletroforese de cada veneno, nas condições expostas, procedíamos a coloração das tiras e em seguida, a decomposição das frações em Registrador de Extinção tipo II Zeiss, obtendo-se os respectivos eletroferogramas.

RESULTADOS

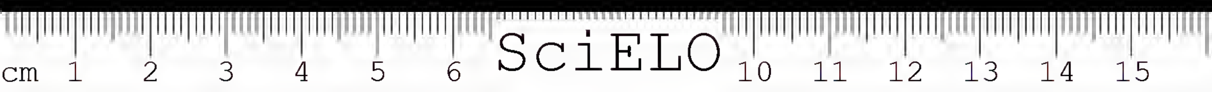
Com a utilização das condições de experimentação por nós padronizadas, obtivemos os resultados que são representados pelo número de frações eletroforéticas de cada veneno. A tabela I, apresenta os dados obtidos.

Tabela I

Comportamento eletroforético sobre "Cellogel" dos seis venenos do gênero Bothrops, em solução a 4%

Espécie de veneno	Número de frações
B. jararaca	15
B. alternatus	11
B. insularis	13
B. jararacussu	9
B. moojeni	9
B. cotiara	10

As tiras de cellogel, submetidas ao Registrador de Extinção possibilitaram os eletroferogramas que ilustram as figuras de 1 a 6.



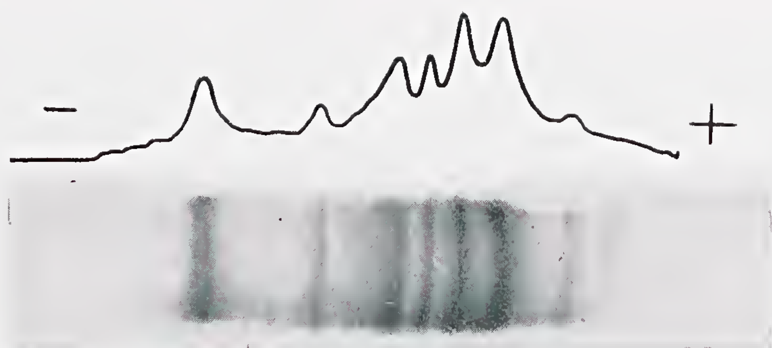


Fig. 1 — Comportamento eletroforético sobre "cellogel" do veneno de *B. jararaca*, em solução a 4%.

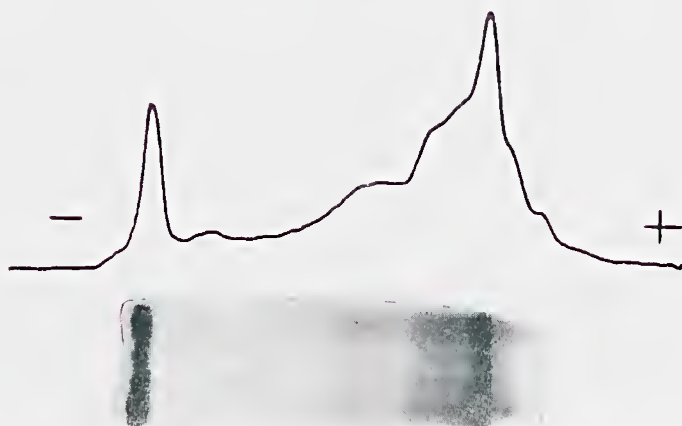


Fig. 2 — Comportamento eletroforético sobre "cellogel" do veneno de *B. alternatus*, em solução a 4%.

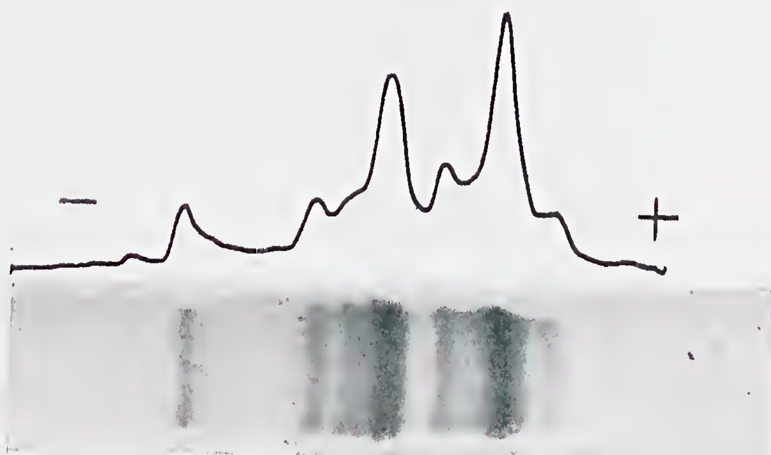


Fig. 3 — Comportamento eletroforético sobre "cellogel" do veneno de *B. insularis*, em solução a 4%.

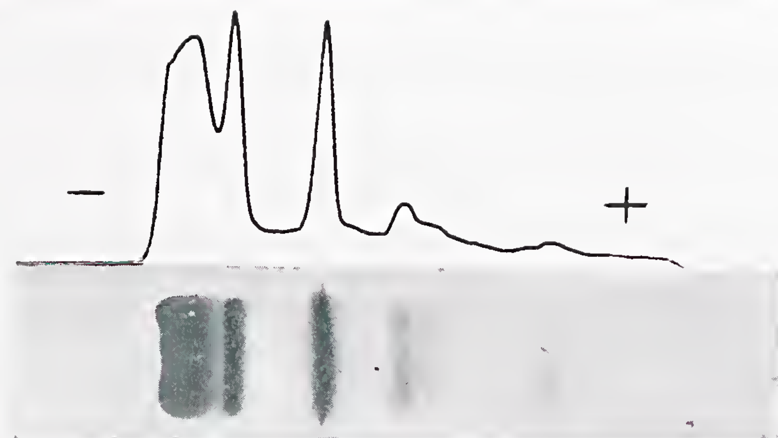


Fig. 4 — Comportamento eletroforético sobre "cellogel" do veneno de *B. jararacussu*, em solução a 4%.

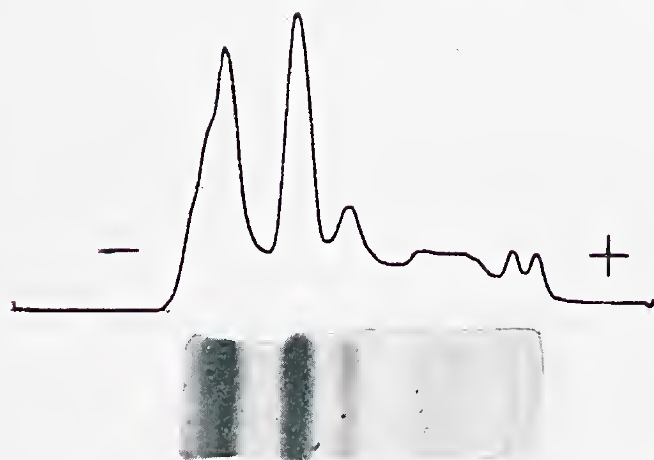


Fig. 5 — Comportamento eletroforético sobre "cellogel" do veneno de *B. moojeni*, em solução a 4%.

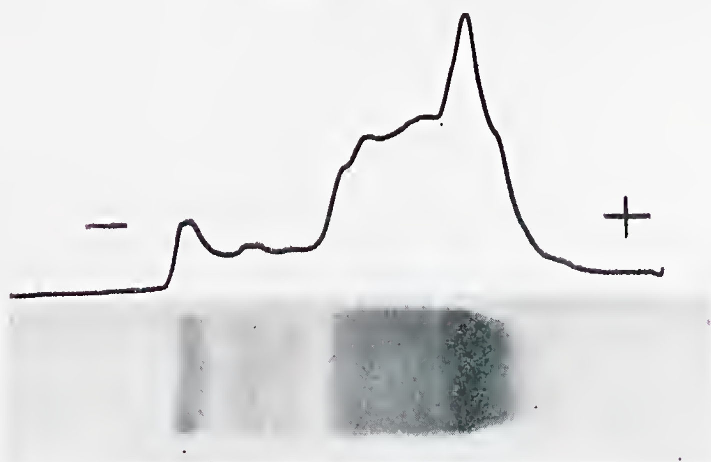


Fig. 6 — Comportamento eletroforético sobre "cellogel" do veneno de *B. cotiara*, em solução a 4%.

DISCUSSÃO

A bibliografia por nós consultada demonstra que, muito embora alguns trabalhos tenham sido realizados objetivando o estudo do comportamento eletroforético dos venenos de serpentes, somente Gonçalves & Vieira (1950), estudaram alguns aspectos de tres venenos botrópicos procedentes do Brasil; todavia, estes autores utilizando-se de papel de filtro como suporte para a eletroforese, obtiveram para o veneno de *B. jararaca,* apenas quatro frações; para o veneno de *B. atrox,* sete frações e para o veneno de *B. jararacussu,* nove frações. Os nossos resultados, foram concordes sòmente no que se refere ao veneno de *B. jararacussu,* pois também determinamos a existência de nove frações; para os outros dois venenos, determinamos a presença de maior número de componentes pois que *B. jararaca* apresentou 15 frações e *B. moojeni* nove frações. Este aumento do número de frações por nós encontrado parece ser consequente da tecnologia aplicada e talvez consequente também a origem dos venenos utilizados pelos autores citados, visto não terem esclarecido a técnica adotada para a extração. Além destas considerações, os venenos utilizados por Gonçalves Vieira, loc. cit., foram fornecidos pelo "Instituto Ezequiel Dias", localizado no Estado de Minas Gerais, portanto obtidos de serpentes provenientes de áreas geográficas distintas daquelas que forneceram o material por nós utilizados, o que possibilitaria segundo Schenberg (1958-1963), uma variabilidade na composição da peçonha. A metodologia por nós aplicada com a utilização de tiras de "Cellogel", permitiu uma melhor caracterização das frações constituintes dos venenos em um tempo de exposição eletroforética bem menor (90 minutos).

Os resultados obtidos pela eletroforese em "Cellogel" dos venenos das espécies *B. alternatus, B. insularis* e *B. cotiara,* são inéditos pois não consta na literatura qualquer trabalho relacionado com a eletroforese desses venenos.

O veneno da espécie *B. jararaca,* quando comparado com as outras 5 espécies analizadas, sugere ser, dentre as peçonhas por nós estudadas, aquela que possui um maior número de frações eletroforéticas.

CONCLUSÕES

1. A separação eletroforética dos venenos de *B. jararaca, B. jararacussú* e *B. moojeni* em tiras de "Cellogel", quando comparada com a eletroforese em papel, revela que além de ser um método muito mais rápido, permitiu melhor separação e, conseqüentemente, obtém-se a revelação de maior número de frações.

2. A separação eletroforética em "Cellogel" do veneno de *B. jararaca,* revelou 15 frações eletroforéticas sendo pois a espécie que apresentou maior número de frações dentre as peçonhas das espécies de *Bothrops* estudadas;



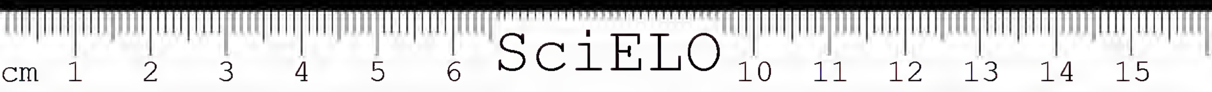
3. A separação eletroforética dos venenos de *B. alternatus, B. insularis* e *B. cotiara*, em tiras de "Cellogel", foi realizada pela primeira vez, apresentando-se estes venenos, com 11, 13 e 10 frações, respectivamente.

SUMMARY — Electrophoretic analysis of six samples of snake venom of the genus *Bothrops* Wagler, 1824, on "Cellogel" membrane, demonstrated a better separation of the venom components in lesstime of exposition, when compared with other techniques.

UNITERMS — Electrophoretic study of snake venoms on "Cellogel"; electrophoretic study on *Bothrops* venoms.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFONSO, E. — On the electrophoresis of proteins on cellulose acetate membranes. *Clin. Chim. Acta.*, **6**: 883-885, 1961.
2. BARTLETT, R. C. — Rapid cellulose acetate electrophoresis. I serum proteins. *Clinical Chemistry*, **9**: 317-324, 1963.
3. BRAZIL, V. & PESTANA, B. R. — Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. *Rev. méd. São Paulo*, **12**: 415-425, 1909.
4. COLFS, B. & VERHEYDEN, J. — Electrophoresis and sudan black staining of lipoproteins on gelatinised cellulose acetate. *Clin. chim. Acta.*, **18**: 325-334, 1967.
5. FURLANETTO, R. S. — *Emprêgo de camundongos tratados com dose preparatória de venenos bothrópicos para a avaliação de DL50 dêsses venenos.* São Paulo, 1965, p. 8-9. [Tese Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
6. GONÇALVES, J. M. — Análise eletroforética de serpentes brasileiras. In: Congreso Sudamericano de Química, 4º, Santiago do Chile, 1948.
7. GONÇALVES, J. M. & POLSON, A. — The electrophoretic analysis of snakes venoms. *Arch. Biochem.*, **13**: 253-259, 1947.
8. GONÇALVES, J. M. & VIEIRA, L. G. — Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. *An. Acad. bras. Cienc.* **22**: 141-150, 1950.
9. KÖENIG, P. — Applicação da electrophorése nos trabalhos chimicos com quantidades pequenas. In: Congresso Sul-Americano de Chimica, 3.º, Rio de Janeiro e São Paulo, 1937. v. 2, p. 334-336
10. PAGET, M. & COUSTENOBLE, P. — Microelectrophorèse des próteines du sérum sur acétate de cellulose gélatineux. *Ann. Biol. clin.*, **23**: 1209-1219, 1965.
11. PAGET, M. & COUSTENOBLE, P. — Microélectrophorèse des glycoprotéides sériques sur acétate de cellulose gélatineux et sur polyacétate de cellulose. *Ann. Biol. clin.*, **24**: 81-185, 1966.
12. POLSON, A.; JOUBERT, F. G. & HAIG, D. A. — Electrophoretic examination of cobra venoms. *Biochem. J.*, **40**: 265-269, 1946.
13. RITTS, Jr. R. E. & ONDRICK, F. W. — Electrophoresis of serum proteins on cellulose acetate. *The American Journal of Clinical Pathology*, **41**: 321-331, 1964.
14. ROSENFELD, G. — Acidentes por animais peçonhentos. In: VERONESI, R., ed. Doenças Infecciosas e parasitárias. 4a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1969, p. 979-992.

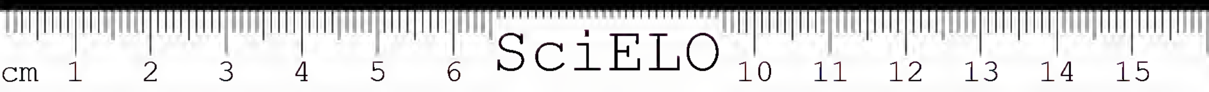


15. SCHENBERG, S. — Estudo comparativo da composição do veneno de *Bothrops neuwiedi* em placas de Ouchterlony. *Ciência e Cultura*, 10: 163-164, 1958.

16. SCHENBERG, S. — Immunological (Ouchterlony method) identification of intrasubspecies qualitative differences in snake venom composition. *Toxicon*, 1: 67-75, 1963.

17. SILES VILLARROEL, M. — *Contribuição ao estudo de venenos de serpentes do gênero Bothrops (B. jararaca, B. alternatus, B. insularis, B. jararacussu, B. atrox* e *M. cotiara*). São Paulo, 1972. [Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo]

Recebido para publicação em 16.VI.73.
Aceito para publicação em 12.X.73.



Mem. Inst. Butantan
37: 91-97, 1973.

LOCALIZAÇÃO DO FATOR COAGULANTE NO ESPECTRO ELETROFORÉTICO DO VENENO DE *Bothrops Moojeni*

MEDARDO SILES VILLARROEL *
REYNALDO SCHWINDT FURLANETTO **
FLAVIO ZELANTE *
RAYMUNDO ROLIM ROSA***

RESUMO — Os autores, através de eletroforese sobre membrana de "Cellogel" procuraram isolar o fator coagulante do veneno de *B. moojeni*. Verificando ser possível a recuperação deste fator após a corrida eletroforética, obtiveram a recuperação de 33,3% quando comparado com o veneno "in natura" e de 80% quando comparada com o veneno eluido de tiras de "Cellogel", sem a corrida eletroforética. Demonstraram haver fortes indicações de que o fator coagulante é constituído por duas frações.

UNITERMOS — Eletroforese em "Cellogel" do veneno de *B. moojeni;* isolamento dos fatores coagulantes.

INTRODUÇÃO

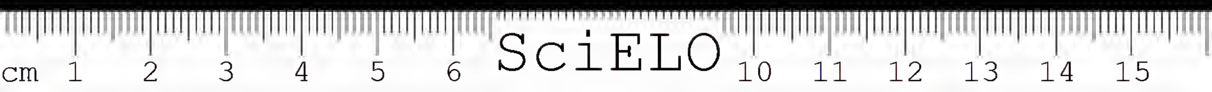
Trabalhos anteriores (Siles Villarroel, 1972; Siles Villarroel et al, 1973) demonstram as vantagens da utilização de membranas de "Cellogel", para a corrida eletroforética dos venenos ofídicos. Os autores obtiveram uma melhor separação e visualização das diversas frações constituintes dos venenos estudados.

Como os venenos botrópicos possuem, fundamentalmente, duas ações distintas, proteolítica e coagulante (Rosenfeld et al 1959), cada fração visualizada na membrana de "cellogel" representaria pois um ou mais constituintes daquelas propriedades farmacológicas. Como a ação coagulante dos venenos botrópicos é, indiscutivelmente, o componente responsável pelas mortes rápidas conseqüentes do acidente ofídico (Furlanetto 1965) procuramos tentar visualizar esse componente no espectro eletroforético, onde poderia estar representado por uma ou mais frações. Haveria ainda a possibilidade de ser isolada esta fração ou frações e, conseqüentemente de se obter praticamente em estado de pureza, ou componente ou componentes responsáveis pela coagulação do plasma.

Tentativas anteriores foram feitas objetivando este isolamento, tanto dos venenos botrópicos, quanto dos de outras serpentes cujas peçonhas apresentam a mesma propriedade farmacológica. Foram utilizados os processos físico-químicos e de eletroforese em papel , (Holtz & Raudonat, 1956; Banerjee et al,

* Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.
** Professor Catedrático do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.
*** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

Endereço para correspondência:
C.P. 4365, São Paulo, Brasil.



1960; Klobusitzky & Köenig, 1935-36; Köenig, 1937; Grasset & Schwartz, 1955). Parece no entanto serem os trabalhos de Henriques et al, 1959 e 1960; Fichman & Henriques, 1962 aqueles que conseguiram obter melhor purificação do fator coagulante.

Nahas et al (1964), reconheceram pela primeira vez a existencia de, pelo menos, dois fatores responsáveis pela atividade coagulante dos venenos botrópicos e sugeriram a necessidade de investigações mais profundas.

Baseados nestes aspectos, e considerando que, dentre os venenos botrópicos o da espécie *B. moojeni* é que apresenta maior atividade coagulante, (Rosenfeld et al, 1959; Furlanetto, 1965) nos propuzemos a partir de seu espectro eletroforético, determinar a exata localização do fator ou dos fatores responsáveis pela referida atividade e, em seguida, tentar separa-los do complexo apresentado pelo veneno "in natura".

MATERIAIS E MÉTODOS

Veneno Ofídico

O veneno da espécie *B. moojeni* Hoge, 1965* utilizado em nosso experimento, procedente do Instituto Butantan, foi obtido por extração manual de várias serpentes adultas, cristalizado por secagem a vácuo e mantido a temperatura de geladeira (0-4°C). Utilizamos a solução do veneno a 4% em solução fisiológica (0,85% de NaCl) mantido em frascos hermeticamente fechados e a temperatura de -25°C (Furlanetto, 1965; Siles Villarroel, 1972).

Eletroforese em "Cellogel"

Aplicamos os mesmos materiais e as mesmas técnicas já descritas em trabalhos anteriores (Siles Villarroel, 1972; Siles Villarroel et al, 1973).

Determinação da Dose Mínima Coagulante (D..M.C.) ou Unidade Coagulante (U.C.)

O esquema técnico foi tomado de Furlanetto (1965). A Dose Mínima Coagulante (D.M.C.) ou Unidade Coagulante (U.C.) é, segundo o autor a dose de produto coagulante ou de veneno, dissolvido depois de seco, que no volume de 0,2 ml é capaz de promover a coagulação, entre 8 e 10 minutos e a 37°C, de 1,0 ml de plasma normal de cavalo, adicionado de 0,2% de oxalato de potássio (o plasma deve ser colhido no dia do ensaio).

O ensaio para essa determinação foi conduzido em tubos de 14 x 140 mm imersos em banho-maria a 37°C. Considerava-se o plasma coagulado, quando se formava bloco de fibrina capaz de escorregar pela parede do tubo, quando este era inclinado.

Como na eletroforese, trabalhávamos com a concentração de veneno a 4%, determinávamos a D.M.C. sempre a partir dessa solução.

---

* A *Bothrops moojeni* Hoge, 1965, era, até essa data, classificada como *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758).

SILES VILLARROEL, M., FURLANETTO, R. S., ZELANTE, F. & ROLIM ROSA, R. — Localização do fator coagulante no espectro eletroforético do veneno de *Bothrops moojeni*. *Mem. Inst. Butantan*, 37: 91-97, 1973.

RESULTADOS

Determinamos, preliminarmente, que 1,0 ml da solução a 4% do veneno de *B. moojeni* por nós utilizado, continha 100.000 U.C., portanto, uma U.C. correspondia a 0,4 µg do veneno seco. Tais valores mostram que o volume de 0,003 ml a ser aplicado na tira de "cellogel" equivale a 120 µg de veneno seco, ou seja, a 300 U.C.

Como pretendíamos fazer a eletroforese do veneno em "cellogel" e depois eluir as várias frações, nos preocupamos em saber quanto era possível recuperar, em termos de D.M.C., da quantidade de veneno inicialmente colocada nas tiras de "cellogel", sem corrida eletroforética. Para isso, aplicamos o volume de 0,003 ml num ponto da tira de "cellogel" e aí deixamos, sem submeter à corrida eletroforética, por 90 minutos. Após esse tempo eluímos em 0,5 ml de solução fisiológica durante 1 hora em geladeira a 4°C. Foi possível recuperar 50 µg, equivalente a 125 U. C. de veneno seco.

Após as determinações preliminares acima expostas, realizamos a corrida eletroforética do veneno em duas tiras de "cellogel". Uma delas sofreu o processo de coloração e descoloração enquanto a outra foi mantida intacta. A tira corada tinha por finalidade servir como padrão, a fim de se poder estabelecer a localização das várias frações na tira não corada. Em seguida, com o auxílio de uma régua, determinamos a área ocupada na tira pelas várias frações. Transportamos as mesmas medidas para a tira não corada e numeramos de 1 a 7 as várias áreas delimitadas, que foram, posteriormente, cortadas isoladamente. Os fragmentos 1 e 5 eram, cada um, integrados por duas frações — frações 1 e 2 e 6 e 7, respectivamente — que se apresentaram bastante próximas, o que tornava difícil separá-las. As frações analizadas, constam da figura 1.

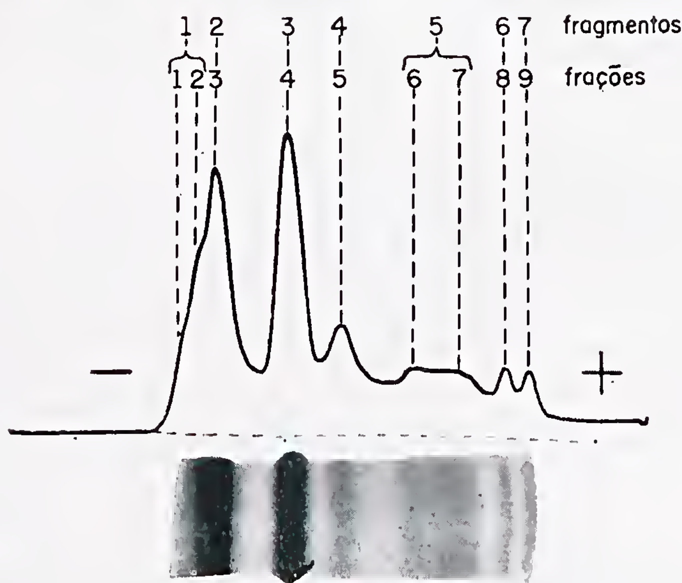


Fig. 1 — Delimitação das áreas separando os nove componentes do veneno de *B. moojeni*.

Cada fragmento da tira de "cellogel" foi eluído em 0,5 ml de solução fisiológica, durante 1 hora. A seguir, de cada eluato, retiramos um volume de 0,2 ml e adicionamos sobre 1,0 ml de plasma normal oxalatado de cavalo, conforme descrito em "Materiais e Métodos". A tabela I apresenta os resultados obtidos.

TABELA I

Determinação do poder coagulante dos vários fragmentos obtidos por eluição após a eletroforese em "Cellogel" (veneno de *B. moojeni*)

Fragmento eluído	Volume de plasma oxalatado (ml)	Volume de material eluído (ml)	Resultado
1	1,0	0,2	Não coagulou
2	1,0	0 2	Não coagulou
3	1,0	0 2	Não coagulou
4	1,0	0 2	Início de coagulação
5	1,0	0 2	Coagulação imediata
6	1,0	0,2	Início de coagulação
7	1,0	0 2	Não coagulou

Verifica-se pela tabela I que o fragmento cinco, integrado pelas frações 6 e 7, é o que contem maior concentração do fator coagulante.

Como nosso trabalho objetivava também determinar a quantidade do fator coagulante que poderia ser recuperada, realizamos diluições seriadas do material eluído do fragmento 5. Dessa forma foram realizadas várias diluições do eluído desse fragmento. A tabela II apresenta os resultados obtidos.

TABELA II

Determinação da dose mínima coagulante do fragmento n. 5

Diluição do eluato do fragmento n. 5	Volume de plasma oxalatado (ml)	Volume dos eluato (ml)	Tempo de coagulação
1/5	1,0	0,2	1 minuto
1/10	1,0	0,2	1 minuto
1/20	1,0	0,2	2 minutos
1/40	1,0	0,2	10 minutos
1/80	1,0	0,2	Não coagulou

Verifica-se que a atividade coagulante representada em unidades coagulantes (U.C.) é demonstrável até na diluição 1/40.

A análise das tabelas I e II mostra que a fração coagulante está localizada quase que totalmente no eluído do fragmento n.º 5 da tira de "cellogel",

que por sua vez era uma mistura das frações 6 e 7 do espectro eletroforético. Como foram usados na corrida eletroforética, 0,003 ml da solução de veneno a 4%, podemos concluir que recuperamos 80% do fator coagulante, quando comparado com a recuperação obtida da eluição da tira de "cellogel" não submetida à eletroforese.

DISCUSSÃO

Com a utilização da eletroforese sobre tiras de "cellogel" pudemos localizar, no espectro eletroforético do veneno de *B. moojeni*, as frações responsáveis pela coagulação do plasma oxalatado. Estas seriam as frações seis e sete, localizadas no fragmento cinco da tira de "cellogel".

A observação da tabela I demonstra que, a ação de 0,2 ml do eluato correspondente ao fragmento cinco, agindo sobre 1,0 ml de plasma oxalatado, promovia a sua coagulação imediata, ao passo que, os eluatos referentes aos fragmentos quatro e seis, induziram apenas uma coagulação incipiente do plasma, em 10 minutos. Os demais eluatos não promoveram a coagulação do plasma. A ocorrência da coagulação incipiente, foi por nós considerada como sendo conseqüente de uma possível contaminação dos fragmentos quatro e seis, por uma pequena parte do espectro dos fatores localizados no fragmento cinco que, indiscutivelmente, representam o fator coagulante do veneno em questão. Baseados nestes resultados propusemo-nos determinar a atividade coagulante contida no fragmento cinco o que, em última análise, significa a determinação do número de unidades coagulantes (U.C.), ou Dose Mínima Coagulante (D.M.C.), presentes nessa fração.

Como através dos nossos testes preliminares, pudemos determinar que, das 300 U.C. iniciais colocadas nas tiras de "cellogel", são recuperáveis, por eluição simples sem corrida eletroforética, 125 U.C., nos foi possível estabelecer uma relação com os resultados obtidos após a eletroforese. Os dados da tabela II nos levaram a calcular que a eluição do fragmento cinco, resulta em 100 U.C. Como este resultado equivale a uma redução de 20% sobre o total que seria recuperável sem eletroforese, podemos interpretar tal aspecto, como sendo, possivelmente, conseqüente das perdas representadas pela contaminação das áreas quatro e seis, pelos espectros dos fatores coagulante, contidos na área cinco. Acreditamos também na hipótese de que, a eletroforese possa ter desnaturado parte do fator coagulante. Parece-nos ser esta, a primeira vez que se demonstra a localização, no espectro eletroforético do veneno de *B. moojeni*, das frações coagulantes. Tal fração contém duas ondulações, conforme demonstra o eletroferograma (fig. 1). Talvez essas duas frações, que não conseguimos separar, no presente trabalho, representem as frações descritas por Nahas et al (1964). Esse aspecto, no entanto, demanda outras investigações.

CONCLUSÕES

1. O fator coagulante do veneno da espécie *Bothrops moojeni* é provavelmente constituído por duas frações, correspondentes às de números seis e sete do espectro eletroforético.

2. Após a corrida eletroforética em "cellogel" de uma quantidade de veneno de *B. moojeni*, equivalente a 300 U.C., foi possível recuperar 100 U.C. que representam 33,3% de sua capacidade coagulante inicial e a 80% de recuperação quando comparada com a capacidade coagulante do eluato da tira de "cellogel" não submetida à corrida eletroforética.

SUMMARY — "Cellogel" membrane electrophoresis was used for isolation of the coagulation factor of the *B. moojeni* snake venom. The coagulation factor. after electrophoresis, was recovered in 33,3% when compared with the venom "in natura", and in 80% when compared with the venom from the "Cellogel" strips. It seems that the coagulating factor consists of two fractions.

UNITERMS — Electrophoretic study on "Cellogel" of *B. moojeni* venom; isolation of coagulation factors.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BANERJEE, R.; DEVI, A. & SARKAR, N. — Isolation and purification of a coagulant from snake venom of the species *Bothrops jararaca* and the study of its properties. *Thrombs, Diathes. hamorrhag.* (Stuttg.), 5: 296-303, 1960.

2. FICHMAN, M. & HENRIQUES, O. B. — Further studies on the purification of the blood-clotting enzyme from the venom of *Bothrops jararaca*. *Arch. Biochem.*, 98: 95-99, 1962.

3. FURLANETTO, R. S. — *Emprêgo de camundongos tratados com dose preparatória de venenos bothrópicos para a avliação de DL50 dêsses venenos.* São Paulo, 1965, p. 8-9. [Tese Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo]

4. GRASSET, E. & SCHWARTZ, D. E. — Fractionnement par électrophorése sur papier du venin de *Vipera russellii*. Propriétés et dosages des facteurs coagulant et anticoagulant de ce venin. *Ann. Inst. Pasteur*, 88: 271-281, 1955.

5. HENRIQUES, O. B.; MANDELBAUM, F. R. & HENRIQUES, S. B. — Blood-clotting activity of the venom of *Bothrops jararaca*. *Nature* (Lond.), 183: 114-115, 1959.

6. HENRIQUES, O. B.; FICHMAN, M. & HENRIQUES, S. B. — Partial purification and some properties of the blood-clotting factor from the venom of *Bothrops jararaca*, *Biochen. J.*, 75: 551-556, 1960.

7. HOGE, A. R. — Preliminary account on neotropical *Crotalinae* (Serpentes *Viperidae*). *Mem. Inst. Butantan*, São Paulo, 32: 109-184,1965.

8. HOLTZ, P. & RAUDONAT, H. W. — Über Beziehungen zwischen proteolytischer Aktivität und blutcoagulierender sowie braddykininfreisetzender Wirkung von Schlangengiften, *Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. exp. Path. Pharmak.*, 229: 113-122, 1956.

9. KLOBUSITZKY, D. von & KÖENIG, P. — Estudos biochimicos sôbre os venenos das serpentes do gênero *Bothrops*. III. Separação do principio coagulante dentre a bothropotoxina e outras substancias contidas na secreção natural. *Mem. Inst. Butantan*, 10: 223-236, 1935-1936.

10. KOENIG, P. Applicação da electrophorése nos trabalhos chimicos com quantidades pequenas. In: Congresso Sul-Americano de Chimica, 3º, Rio de Janeiro e São Paulo, 1937, v. 2, p. 334-336.



11. NAHAS, L.; DENSON. K. W. E. & MACFARLANE, R. G. — A study of the coagulant action of eight sanke venoms. *Thrombos. Diathes. haemorrhag.* (Stuttg.), 12: 355-367. 1964.

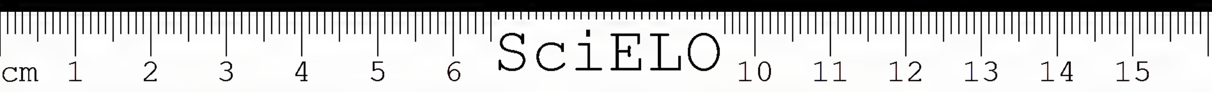
12. ROSENFELD, G. — Acidentes or animais peçonhentos. In.: VERONESI, R., ed. — *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 4ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1969, p. 979-992.

13. ROSENFELD, G.; HAMPE, O. G. & KELEN, E. M. A. — Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms; determination of coagulant and fibrinolytic of different species. *Mem. Inst. Butantan*, 29: 143-163, 1959.

14. SILES VILLARROEL, M. — Contribuição ao estudo de venenos de serpentes do Gênero *Bothrops* (*B. jararaca, B. alternatus, B. insularis, B. jararacussu, B. atrox* e *B. cotiara*). São Paulo, 1972, Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

15. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; FURLANETTO ,R. S. & ZELANTE, F. — Eletroforese sobre "Cellogel" dos venenos de *B. jararaca, B. alternatus, B. insularis, B. jararacussu, M. moojeni* e *B. cotiara*. *Mem. Inst. Butantan*, 37, 1973.

Recebido para publicação em 16.VI.73
Aceito para publicação em 12.X.73




cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
10 11 12 13 14 15

Mem. Inst. Butantan
37: 99-107, 1973

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA DETERMINAÇÃO DA DL50 DE VENENOS BOTRÓPICOS INOCULADOS POR VIA VENOSA EM CAMUNDONGOS — *Mus musculus* Linnaeus, 1758

I. FENÔMENOS QUE OCORREM NA TENTATIVA DE DETERMINAÇÃO DA DL50.

REYNALDO SCHWINDT FURLANETTO *
RAYMUNDO ROLIM ROSA **
MEDARDO SILES VILLARROEL ***
YARA QUEIROGA SIRACUSA ****

RESUMO — Os autores demonstraram pela inoculação intravenosa de doses crescentes de veneno botrópico, em camundongos, que mortes conseqüentes não ocorrem em proporção com a progressão da dose, tendo a tendência de aparecerem dentro dos 10 primeiros minutos após a inoculação (mortes imediatas), sendo impossível a reprodutibilidade da DL50. Os animais que sobrevivem a morte imediata com doses relativamente baixas de veneno não sofrem morte tardia. Os animais que sobrevivem a morte imediata com doses mais altas de veneno, poderão ou não morrer tardiamente. Acreditam, pois, que as mortes imediatas sejam decorrentes da coagulação intravascular que pode ocorrer ao acaso devido ao fator coagulante de tais venenos e que as mortes tardias revelam o verdadeiro poder tóxico.

UNITERMOS — Venenos botrópicos — Fator coagulante de venenos botrópicos — DL50 de venenos botrópicos.

INTRODUÇÃO

Desde 1907, fundamentado nos trabalhos de Vital Brazil, vem o Instituto Butantan aferindo a potencia dos soros antipeçonhentos através de misturas "in vitro" de dose fixa de soro (1 ml) com quantidades variáveis do veneno seco, misturas essas inoculadas, após tempo apropriado de contato, em pombos, por via venosa. Na aferição desses soros deve-se utilizar veneno seco "padronizado" conforme preceitua a Farmacopéia Brasileira (1959), isto é, veneno cuja Dose Mínima Mortal (D.M.M.) para pombo de 280 a 320 g seja no máximo de 1,5 μg para veneno de serpentes do gênero *Crotalus Linnaeus*, 1758 e de 40 μg no máximo, para veneno de serpentes do gênero *Bothrops Wagler*, 1824.

* Ex-chefe da Secção de Imunoterapia do Instituto Butantan. Atual Professor Catedrático do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.
** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan. Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.
*** Ex-Assistente do Setor de Soros Anti-peçonhentos do Instituto Butantan. Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
**** Chefe da Secção de Soros do Instituto Butantan.

Endereço para correspondência:
C.P. 4365, São Paulo, Brasil.

FURLANETTO, R. S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & SIRACUSA, Y. Q. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758. I — Fenômenos que ocorrem na tentativa de determinação da DL50.
Mem. Inst Butantan, 37: 99-107, 1973.

A padronização em pombo, por esse processo, tem sofrido graves críticas, baseadas fundamentalmente na não reprodutibilidade dos resultados alcançados. O próprio Vital Brazil, em colaboração com Rangel Pestana (1909), já antevia argumentos contrários a tal tipo de padronização.

Tal processo, embora ainda utilizado oficialmente, contraria frontalmente os ditames da técnica moderna, que busca a padronização de produtos biológicos através de provas populacionais, do tipo da DL50, isto é, a prova que determina a dose de um produto que seria capaz de matar 50% de um grupo de animais inoculados.

Esse procedimento é obviamente superior àquele, que emprega freqüentemente um ou dois animais por prova, deixando, assim, de levar em conta as variações individuais.

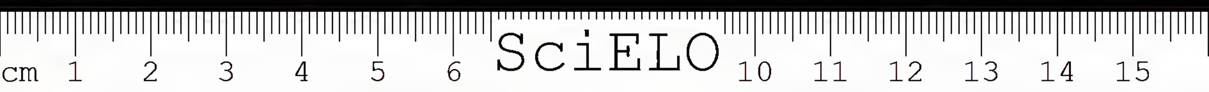
Nesse sentido, outras objeções podem ser alinhadas contra o uso do pombo como animal de prova, a maior delas sendo quiçá a raridade com que ele é citado para tal fim, na literatura. Realmente, trata-se de animal de criação onerosa, de nutrição pouco estudada, não sendo usual sua criação em linhagens geneticamente homogêneas. Sobre sua patologia, o exame perfunctório de obras como a de Reis e Nóbrega (1936) é suficiente para demonstrar sua complexidade.

O camundongo, em contraposição, tem sido usado internacionalmente (Grasset, 1949, África do Sul; Tanaka, 1941, Japão; National Inst. of Health, 1953, U.S.A.; Schlossberger *et al*, 1936, Alemanha; Hazra *et al.*, 1945/46, India; Lin, 1962, China) na padronização de venenos e antivenenos respectivos. O camundongo oferece, de fato, vantagens para tal fim: cria-se fácil e economicamente no laboratório e, sendo muito prolífero, dele podem ser obtidas rapidamente linhagens geneticamente homogenizadas por seleção através de acasalamentos consangüíneos; além disso, tanto sua patologia como suas exigências nutricionais estão muito melhor estudadas que as do pombo.

Entre nós Slotta e Syszka (1937) fizeram tentativa de adoção do camundongo e Schöttler (1951b) já advogou suas vantagens, tendo contribuição experimental a respeito.

Neste trabalho retomamos, pois, o estudo do camundongo para padronização de venenos ofídicos, escolhendo de início, intencionalmente, os botrópicos, por serem os que têm oferecido maior soma de problemas.

Ao abordar a metodologia para padronização de produtos dessa natureza vem logo à mente a via de inoculação e, naturalmente, a contribuição de Schöttler (1951a-1951b-1951c-1952-1954-1955-1955/56 e 1958). Esse autor, estudando venenos botrópicos, explorou as vias venosa e subcutânea, encontrando em ambas grandes dificuldades, oriundas da irregularidade dos resultados alcançados. Schöttler atribuiu tais irregularidades a grande número de fatores que agiriam sobre a resistência individual dos camundongos: sexo, peso, pureza de linhagem, idade dos animais e mesmo a de seus progenitores no ato do acasalamento, além de várias condições externas, tais como — temperatura, método de contenção, estação do ano, espaço disponível, volume injetado e muitas outras. Esse autor tentou em vão o controle desses fatores,



em particular no caso da via venosa. Apelou finalmente para delineamentos estatísticos que estimou fossem capazes de lançar no erro residual do método aquelas variações individuais, dando ênfase especial aos delineamentos baseados em grandes números de animais por lote.

Desencorajado pelos resultados colhidos, mormente com os obtidos com a via venosa, deu preferência à via sub-cutânea, apesar das variações dos resultados permanecerem oscilando entre valores extremos muito distantes.

Analisando a contribuição de Schöttler, colhemos a impressão de que algum aspecto fundamental teria passado despercebido uma vez que frustraram todas as tentativas desse autor de controlar causas de variação de resistência. intrínsecas ao animal ou adstritas ao meio. Ocorreu-nos, então, o estudo de causas dependentes do próprio veneno botrópico. Para essa concepção contribuiu fortemente o conhecimento de que, para outros venenos, ensaios dessa natureza levam a resultados satisfatoriamente regulares.

MATERIAL E MÉTODOS

Venenos utilizados:

Trabalhamos com venenos de serpentes do gênero *Bothrops* das seguintes espécies: *B. jararaca* (Wied, 1824), *B. moojeni* (Hoge, 1965), *B. pradoi* (Hoge, 1947), *B. insularis* (Amaral, 1921), *B. neuwiedi* Wagler in Spix, 1824, *B. fonsecai* Hoge et Belluomini, 1959 e *B. jararacussu* Lacerda, 1884.

Todos os venenos foram colhidos no serviço de rotina do Instituto Butantan. As serpentes provenientes, em geral, do Estado de São Paulo ou de Estados próximos são identificadas e mantidas em gaiolas isoladas e sofriam uma extração de venenos cada 15 dias. O produto obtido era resultante de uma mistura de venenos de várias serpentes de idade e procedência diferentes, porém sempre de animais da mesma espécie; depois de centrifugado era dessecado a vácuo à temperatura ambiente; após a cristalização, era pesado, colocado em frascos hermeticamente fechados e estocado em geladeira $\pm$ 4° C. Segundo Slotta e Syszka (1937) o veneno dessecado nessas condições mantém sua atividade por longo tempo, o que é também confirmado por Schöttler (1951c-1952 e 1955).

Quantidades de veneno seco da ordem de 100 a 400 µg/ml eram dissolvidas em solução fisiológica e mantidas como soluções básicas, em "flaconetes" hermeticamente fechados, em congelador a -25° C (Furlanetto, 1965). Para cada ensaio era descongelado um frasco a fim de preparar as doses a serem utilizadas, desprezando-se os eventuais excedentes. O cálculo da razão entre as doses era feito segundo a fórmula $R = \sqrt[n-1]{x}$ onde "n" indica o número de doses a serem utilizadas e "x" a razão entre as doses inicial e final. Quando necessário, a DL50 era calculada pelo método de Reed & Müench (1938).

FURLANETTO, R. S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & SIRACUSA, Y. Q. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758. I — Fenômenos que ocorrem na tentativa de determinação da DL50.
Mem. Inst. Butantan, *37*: 99-107, 1973.

Animais:

Foram utilizados camundongos de 18 a 22 g, sem distinção de sexo, todos provenientes do Biotério Geral do Instituto Butantan; as inoculações eram feitas por via venosa.

RESULTADOS

TABELA I

Ensaios preliminares para tentativa de determinação de DL50 de venenos de B. moojeni ***, *de coleta recente. Foram feitos quatro ensaios em dias diferentes com o mesmo veneno em solução fisiológica de forma a conter em 0,5 ml a dose desejada. Determinação feita por via venosa em camundongos de 18 a 22 g.*

	1º Ensaio			2º Ensaio		
Dose de veneno em μg	Tempo de observação 10min.	24h	48h	Tempo de observação 10min.	24h	48h
4,9	1/6	1/6	1/6	0/6	1/6	1/6
5,5	3/6	3/6	3/6	0/6	0/6	0/6
6,2	4/6	4/6	4/6	2/6	2/6	2/6
6,9	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6
7,7	4/6	4/6	4/6	2/6	2/6	2/6
8,7	4/6	4/6	4/6	5/6	5/6	5/6
9,8	3/6	3/6	3/6	1/6	1/6	1/6

3º Ensaio				4º Ensaio			
Dose de veneno em μg	Tempo de observação 10min.	24h	48h	Dose de veneno em μg	Tempo de observação 10min.	24h	48h
5,5	2/6	2/6	2/6	5,0	1/6	1/6	1/6
6,9	3/6	3/6	3/6	6,5	2/6	2/6	2/6
8,6	2/6	2/6	2/6	8,5	2/6	2/6	2/6
10,8	5/6	5/6	5/6	10,5	3/6	3/6	3/6
13,2	3/6	3/6	3/6	14,0	6/6	—	—
16,2	4/6	5/6	5/6	18,0	3/6	3/6	3/6
				23,0	3/6	3/6	3/6
				30,0	3/6	5/6	5/6
				38,5	6/6	—	—
				50,0	6/6	—	—

Legenda:

O denominador expressa o número total de animais inoculados e o numerador o número de animais mortos naquela dose.
Observação válida para as demais tabelas.

* A *Bothrops moojeni* Hoge, 1965, era anteriormente classificada como *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758).

TABELA II

Ensaio preliminar para tentativa de determinação de DL50 de veneno de B. jararaca de coleta recente. Foi realizado somente um ensaio. O veneno foi diluido em solução fisiológica de forma a conter em 0,5 ml a dose desejada. Determinação feita por via venosa em camundongos de 18 a 22 g.

Dose de veneno em μg	Tempo de observação 10min.	60min.	24h	48h
19,0	1/6	1/6	1/6	1/6
21,3	0/6	0/6	1/6	1/6
23,9	3/6	3/6	4/6	4/6
26,8	1/6	2/6	6/6	—
30,0	0/6	3/6	4/6	4/6
33,8	1/6	1/6	3/6	3/6
38,0	1/6	2/6	5/6	5/6

TABELA III

Ensaio preliminar para tentativa de determinação de DL50 de veneno de B. pradoi de coleta recente. Foi realizado somente um ensaio. O veneno foi diluido em solução fisiológica de forma a conter em 0,5 ml a dose desejada. Determinação feita por via venosa em camundongos de 18 a 22 g.

Dose de veneno em μg	Tempo de observação 10min.	60min.	24h	48h
50,0	3/6	3/6	3/6	3/6
56,0	5/6	5/6	5/6	5/6
63,0	2/6	3/6	4/6	4/6
70,5	6/6	—	—	—
79,0	4/6	5/6	5/6	6/6
89,0	4/6	4/6	5/6	5/6
100,0	3/6	5/6	6/6	—

DISCUSSÃO

As três experiências foram escolhidas entre várias constantes de nossos registros experimentais, por retratarem a fenomenologia típica observada quando se aplicam protocolos dessa natureza para deteminações de DL50 de venenos botrópicos em camundongos, por via venosa.

Na realidade, trabalhamos também, com técnica semelhante, com venenos de *B. insularis, B. jararacussu, B. fonsecai* e *B. neuwiedi,* todas elas apresentando resultados do mesmo tipo.

FURLANETTO, R. S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & SIRACUSA, Y. Q. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758. I — Fenômenos que ocorrem na tentativa de determinação da DL50.
Mem. Inst. Butantan, 37: 99-107, 1973.

Como não nos propuzemos a um trabalho de casuística, e sim investigar a essência dos resultados contraditórios obtidos, cremos não ter grande interesse apresentar os demais protocolos com as quatro outras espécies de *Bothrops* mencionadas. Tais protocolos mostram sempre as mesmas características, que podem ser assim resumidas: a inoculação endovenosa, em camundongo, de doses crescentes de venenos de ofídios do gênero *Bothrops*, na tentativa de se determinar a DL50, não dá resultados homogêneos segundo os quais os números de animais mortos estejam em razoável progressão com o aumento da dose inoculada.

Realmente, ocorrem mortes imediatas, geralmente dentro de 10 minutos, podendo vitimar até a totalidade dos animais com uma dose dada, mas sem guardar correlação evidente com as doses visinhas. Nas menores doses de veneno, os animais que escapam a morte imediata não apresentam intoxicação tardia, isto é, o número de mortes apresentado nos primeiros minutos não sofre alteração quando se prolonga a observação para 24-48 horas. Os animais não vitimados por morte imediata com as doses maiores de veneno, podem sobreviver ou não 24 horas, o que sugere a possibilidade de morte por intoxicação tardia. O valor absoluto de doses menores ou maiores capazes de causar aqueles efeitos varia com a espécie de serpente produtora do veneno.

Os resultados apresentados nas Tabelas I, II e III mostram a dificuldade de se avaliar com precisão a toxicidade dos venenos botrópicos; poder-se-ia imaginar que, abandonando-se o sistema prático e econômico por nós tentado, onde se utilizam poucos animais em cada dose, poder-se-ia obter resultado mais satisfatório, isto é, que aumentando-se substancialmente o número de animais em prova a resposta poderia conduzir a melhores resultados, pois a variação desta, poderia ser imputada a variações individuais de sensibilidade; devemos, no entanto, esclarecer que a imprecisão na determinação da DL50 não constitue assunto novo, tendo sido observada anteriormente por Schöttler (1951a — 1951b — 1951c — 1952 — 1954 — 1955 — 1955/56 e 1958) que tentou contorná-la aumentando o número de animais em experimentação, sem que esse recurso, no entanto, fornecesse a precisão desejada. Esse autor fez investigações amplas sobre toxicidade de venenos de serpentes que ocorrem no Brasil. Utilizou a via sub-cutânea em camundongos e determinou a dose letal média por grama de peso, através de avaliação planimétrica, mediante curva construida com números acumulados de mortos e sobreviventes. Por ter preferido a via sub-cutânea, obteve valores de toxicidade muito baixos (grandes doses de veneno por grama de peso animal); além disso, obteve variação muito ampla dos valores encontrados, o que atribuiu exclusivamente a oscilações de resistência individual; seus achados experimentais levaram-no a afirmar (1951a) que, com certos venenos, um animal pode tolerar, por grama de peso corporal, até 9,5 vezes mais veneno que outro animal da mesma espécie.

Em 1954, o mesmo autor publicou, sobre o assunto, trabalho que caracteriza bem as dificuldades encontradas; procurou resolvê-las cercando-se dos maiores cuidados e controlando numerosos fatores que poderiam quiçá ex-

FURLANETTO, R. S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & SIRACUSA, Y. Q. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758. I — Fenômenos que ocorrem na tentativa de determinação da DL50.
Mem. Inst. Butantan, 37: 99-107, 1973.

plicar as variações de sensibilidade animal, fator ao qual atribuia valor exclusivo na gênese dos resultados que obtinha.

Parece, pois, comprovado que mesmo que se eleve o número de animais em cada dose, o que será pouco prático para os trabalhos usuais, a avaliação da toxicidade dos venenos botrópicos por via venosa no camundongo continua ainda problema complexo; as anomalias desconcertantes que se obtêm entre dose e resposta tem sido até agora atribuidas exclusivamente a variações de resistência individual por numerosos fatores, alguns quase imponderáveis.

No entanto, analisando os resultados das Tabelas I, II e III, que nada mais são do que uma demonstração numérica de fenômeno já anteriormente descrito por outros autores, chamou-nos a atenção um fato ainda não descrito; quando se trabalha com doses não muito elevadas de um dado veneno botrópico, por via venosa no camundongo, o número de animais mortos em 10 minutos a 60 minutos não varia mais com o prolongamento do tempo de observação; não se pode aparentemente detectar intoxicação tardia com essas doses do veneno; por outro lado, parece que os animais escapos à morte imediata com doses relativamente maiores de veneno, podem vir a morrer ou não, mais tardiamente. Doses maiores ainda, provocam a morte imediata de todos os animais. Tal observação nos leva a formular a seguinte hipótese: é de conhecimento geral que os venenos botrópicos possuem enérgico fator (ou fatores) coagulante; tal princípio encontra-se em dose variável segundo as diferentes espécies de ofídios produtores de veneno além de variar também em relação a amostras diferentes coletadas de indivíduos da mesma espécie. Aquele fator, sabe-se hoje, atua diretamente sobre o fibrinogênio transformando-o em fibrina. Ora, na inoculação endovenosa do veneno, poderia haver a formação de coágulos intravasculares; segundo o tamanho do coágulo formado (intensidade da ação coagulante) e, sobretudo, segundo a localização dos coágulos que necessariamente não precisariam ser de grande volume, poderia haver ou não morte do animal sem que a variação da resistência individual assumisse papel preponderante nesse fato. Se assim fosse, as doses menores de veneno poderiam provocar as mortes imediatas segundo distribuição ao acaso, e os animais sobreviventes, não tendo chegado a receber dose tóxica, não iriam alterar o número de mortes com o prolongamento da observação. Por outro lado, os animais que, também por obra do acaso, sobrevivessem às doses relativamente maiores de veneno, poderiam agora, em função da dose e da resistência individual, vir a morrer ou não, através de intoxicação real de manifestação mais tardia. Quando a dose de veneno fosse mais elevada ainda, a ação coagulante seria mais intensa e, provocando coagulação intravascular maciça, provocaria sistematicamente a morte de todos os animais inoculados, em tempo bastante curto, em geral dentro dos primeiros dez minutos. Cada amostra de veneno poderia conter quantidade maior ou menor desse fator coagulante; por essa razão, os níveis capazes de provocar mortes imediatas, deveriam variar em cada veneno ensaiado.

FURLANETTO, R. S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & SIRACUSA, Y. Q. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758. I — Fenômenos que ocorrem na tentativa de determinação da DL50.
Mem. Inst. Butantan, *37*: 99-107, 1973.

CONCLUSÕES

1. Quando vários grupos de camundongos são inoculados por via venosa com doses crescentes de veneno botrópico, as mortes conseqüentes não guardam proporcionalidade com a progressão das doses.

2. As mortes observadas tendem a ocorrer dentro dos dez primeiros minutos após a inoculação (mortes imediatas).

3. Os animais que sobrevivem a morte imediata com doses relativamente baixas de veneno não mais vêm a sofrer morte tardia.

4. Os animais que sobrevivem a morte imediata com doses médias de veneno poderão ou não vir a morrer tardiamente.

5. A ação coagulante dos venenos botrópicos poderá ser a responsável pela ocorrência das mortes imediatas após a inoculação endovenosa, impedindo uma seqüência coerente de resultados que impossibilita o cálculo da DL50.

SUMMARY — The authors demonstrated, by intravenous inoculation of increasing doses of *Bothrops* venom in mice, that the consequent deaths are not proportional to the progression of the doses, and tend to occur in the first 10 minutes after inoculation (immediate deaths), preventing the reproducibility of the LD50. The animals that survive immediate death with high doses of venom may die later or not.

The authors consider the immediate deaths to be a consequence of the intravascular coagulation, which can occur at random due to the coagulant factor of such venoms, and that the late deaths reveal the real toxic power.

UNITERMS — *Bothrops venoms* — Coagulation factor of *Bothrops* venoms — LD50 of *Bothrops* venoms.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRAZIL, V. — A sorotherapia do ophidismo em relação à distribuição geográphica das serpentes. *Rev. med. S. Paulo*, 10(22):457, 1907.
2. BRAZIL, V. & RANGEL PESTANA, B. — Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. V. Ação physiologica. *Rev. méd. São Paulo*, 12(21): 415-425, 1909.
3. FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2a. ed., Indústria Gráfica Siqueira S/A, São Paulo, 1959.
4. FURLANETTO, R. S. — *Emprêgo de camundongos tratados com doses preparatórias de venenos bothrópicos para a avaliação de DL50 desses venenos.* São Paulo, 1965. /Tese — Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo/
5. GRASSET, E. — Standardization of the cobra (naja flava) antibody. A comparative study by the method of assay at various levels and the selected antivenin single-level method. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 2:69-83, 1949.
6. HAZRA, A. K.; LAHRI, D. C. & SOKHEY, S. S. — Sur la standardization du sérum antivenimeux polyvalent préparé par l'Institut Haffkine contre le venin des quatre serpents les plus communs dans l'inde (cobra, bongare, bleu, vipère de Russell et échide Carénnée(. *Bull. Org. Hyg.*, 12: 406-412, 1945/46.



FURLANETTO, R. S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & SIRACUSA, Y. Q. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758. I — Fenômenos que ocorrem na tentativa de determinação da DL50.
Mem. Inst. Butantan, 37: 99-107, 1973.

7. LIN, Chau-Ching — Studies on the assay methods antivenins. *J. Formosan Med. Assoc.*, 61(2): 170-180, 1962.

8. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. U.S. Department of Health, Education and Welfare — Minimum Requerements: Antivenin. Oct., 1, 1953.

9. REED, L. J. & MUENCH, H. — A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27(3): 493-497, 1938.

10. REIS, J. & NOBREGA, P. — *Doenças das aves: tratado de ornithopatologia.* São Paulo, Instituto Biológico 1936, p. 468.

11. SCHLOSSBERGER, H.; BIELING, R. & DEMNITZ, C. — Untersuchungen über Antitoxine gegen Schlangengifte und die Gifte der europäischen und mediterranen Ottern. *Behringwerk-Mitt*, 7:111-150, 1936.

12. SCHÖTTLER, W. H. A. — Toxicity of the principal snake venoms of Brazil *Amer. J. trop. Med.*, 31: 489-499, 1951a.

13. SCHÖTTLER, W. H. A. — Antigen-antibody relations in the present antivenin production of Brazil. *Amer. J. trop. Med.*, 31: 500-509, 1951b.

14. SCHÖTTLER, W. H. A. — On the stability of desiccated snake venoms. *J Immunol.*, 67: 299-304, 1951c.

15. SCHÖTTLER, W. H. A. — Problems of antivenin standardization. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 5: 293-320, 1952.

16. SCHÖTTLER, W. H. A. — Aspectos metodológicos da titulação de soros antipeçonhentos. *Mem. Inst. Butantan*, 26: 249-256, 1954.

17. SCHÖTTLER, W. H. A. — Serological analysis of venoms and antivenins. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 12: 877-903, 1955.

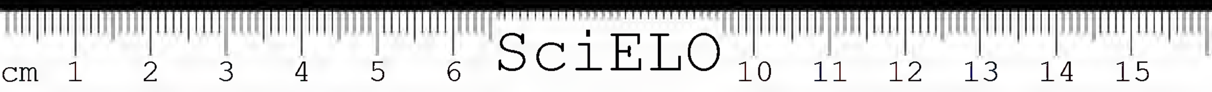
18. SCHÖTTLER, W. H. A. — Observações miscelâneas sobre peçonhas ofídicas e antivenenos. *Mem. Int. Butantan*, 27: 73-83, 1955/56.

19. SCHÖTTLER, W. H. A. — Reference toxins for antivenin standardization. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 19: 341-361, 1958.

20. SLOTTA, C. H. & SYSZKA, G. — Estudos chimicos sobre os venenos ophidicos. I. Determinação de sua toxicidade em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, 11: 109-119, 1937.

21. TANAKA, T. — Studies on venom of husarihebi (Vipera russelli formosensis or Russell's viper). *Zikken Igaku Zasshi*, 25: 89, 1941.

Recebido para publicação em 15.VI.73.
Aceito para publicação em 15.VIII.73




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

Mem. Inst. Butantan
37: 109-122, 1973

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA DETERMINAÇÃO DA DL50 DE VENENOS BOTRÓFICOS INOCULADOS POR VIA VENOSA EM CAMUNDONGOS — *Mus musculus* — Linnaeus, 1758

II. POSSIBILIDADE DE DETERMINAÇÃO DA DL50 ATRAVÉS DA INOCULAÇÃO PRÉVIA DE DOSES INFRA-LETAIS DO PRÓPRIO VENENO.

REYNALDO SCHWINDT FURLANETTO *
RAYMUNDO ROLIM ROSA **
MEDARDO SILES VILLARROEL ***
FLÁVIO ZELANTE ****

RESUMO — Os autores demonstraram que a inoculação de determinadas doses infra-letais (D.P.) de veneno botrópico por via venosa em camundongos leva a uma incoagulabilidade sangüínea cujo ápice é atingido duas horas após. Os animais assim tratados suportam elevadas doses do mesmo veneno sem que ocorram fenômenos de mortes imediatas, atribuíveis a coagulação intravascular, permitindo a avaliação da DL50 do veneno, com satisfatória reprodutibilidade. A mesma tecnicologia permitiu caracterizar outros dois mecanismos de morte pela ação de elevadas doses de veneno: "choque proteotóxico" ou anafilactóide e, intoxicação tardia independentemente dos dois primeiros mecanismos.

UNITERMOS — Veneno botrópico; determinação da DL50 do veneno botrópico; incoagulabilidade sangüínea pelo veneno botrópico; mecanismos de morte pelo envenenamento botrópico.

INTRODUÇÃO

Em trabalho anterior (Furlanetto et al, 1973), confirmaram a impossibilidade da utilização de camundongos para a determinação da DL50 de venenos botrópicos e formularam a hipótese de que as dificuldades inerentes encontradas estivessem ligadas a fatores inherentes ao próprio veneno e não fossem devidas a diferenças de resistência individual do animal conforme acredita Schöttler (1951, 1954 e 1955). Comentando seus resultados destacaram com

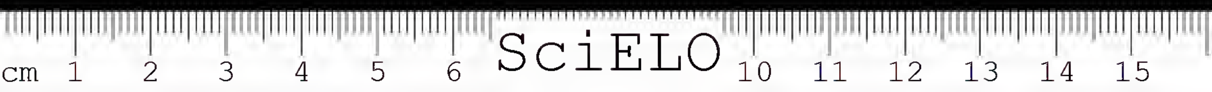
* Ex-Chefe da Secção de Imunoterapia do Instituto Butantan. Atual Professor Catedrático do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan. Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

*** Ex-Assistente do Setor de Soros Antipeçonhentos do Instituto Butantan. Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

**** Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

Endereço para correspondência:
C.P. 4365, São Paulo, Brasil



grande ênfase um fenômeno que passara até então praticamente desapercebido chamando a atenção para a ocorrência de mortes imediatas, geralmente dentro de 10 minutos, quando o veneno é injetado por via venosa, podendo vitimar até a totalidade dos animais com uma dada dose mas sem guardar evidente correlação com as doses visinhas. Tal observação levou-os a formular a hipótese de que tais mortes imediatas fossem devidas ao poder coagulante dos venenos botrópicos e conseqüentes a formação de coágulos intravasculares; segundo o tamanho do coágulo formado, e, sobretudo a localização desses coágulos que necessariamente não precisariam ser de grande volume, poderia haver ou não a morte do animal, sem que a variação da resistência individual assumisse papel preponderante nesse fato.

Fontana (1781) parece ter sido o primeiro autor a classificar o efeito de vários venenos sobre a coagulação sangüínea, tendo distinguido sob esse aspecto dois grupos, um, de venenos coagulantes e outro, de venenos anticoagulantes, conforme os gêneros ou espécies de serpentes de que provinham.

Após esses trabalhos uma série muito grande de observações contraditórias aparecem e Noc (1904), propos-se a esclarecer porque alguns autores classificavam certos venenos como coagulantes, ao passo que outros classificavam os mesmos venenos como anticoagulantes.

No Brasil, os primeiros pesquisadores que se ocuparam com o assunto (Lacerda Filho 1877; Brazil e Pestana 1909), ou então, autores estrangeiros trabalhando com os venenos de serpentes brasileiras, como Samartino (1917), consideraram os venenos de *Bothrops* (na época-classificadas como *Lachesis*) como anticoagulantes "in vivo".

Sem dúvida, foram os trabalhos de Houssay & Sordelli (1917/18) e de Houssay, Sordelli & Negrete (1917/1918) que vieram lançar alguma luz sobre o mecanismo da coagulação sangüínea "in vivo" e "in vitro" com venenos botrópicos. Tendo esses autores estudado a ação do veneno de numerosas espécies, "in vitro", sobre plasma oxalatado, classificaram os venenos em coagulantes e incoagulantes segundo aquele teste; chamam ainda a atenção para que, quando se falar em ação coagulante ou incoagulante de um veneno, deve-se sempre declarar bem distintamente se a experiência é feita "in vivo" ou "in vitro", pois que, neste último caso, "atuariam os venenos por sua ação própria sobre o sangue", ao passo que no primeiro caso, "deve-se acrescentar sobre essa ação, os processos reacionais do organismo vivo". Referem ainda que: Os venenos que são coagulantes "in vitro" produzem "in vivo" efeitos diferentes segundo a dose e a via de administração. Se a dose é alta e a absorção é rápida (por exemplo: injeção venosa) produz-se a coagulação intravascular do sangue em massa ou *parcialmente*, isto é, a mesma ação que "in vitro". Porém quando a dose não é tão alta, ou que é mais importante, a absorção mais lenta (injeção sub-cutânea), observa-se que após 2 1/2 a 10 minutos, o sangue se torna incoagulável e permanece definitivamente líquido.

Houssay & Sordelli, loc. cit. demonstraram ainda que a capacidade coagulante "in vitro" dos venenos botrópicos, não atua por intermédio de uma ativação da trombina, sobre a qual são inativos, mas sim por uma ação direta

sobre o fibrinogênio; demonstraram ainda que "in vitro", atuando sobre o fibrinogênio, os venenos botrópicos têm uma ação variável segundo a dose, isto é, transformando-o em fibrina nas doses coagulantes, e destruindo-o pela capacidade proteolítica em doses altas, exatamente aquelas que apresentam atividade incoagulante "in vitro".

Ainda Houssay & Sordelli (1920) trouxeram valioso subsídio ao esclarecimento da atividade da fração coagulante dos venenos botrópicos "in vivo", ao estabelecerem com maior precisão, a seqüência de efeitos que se pode obter no animal, na dependência da dose e da via de administração.

Arthus (1912) havia já mostrado que coelhos inoculados com venenos botrópicos, por via sub-cutânea, suportavam horas depois, a inoculação endovenosa de dose que provocariam a trombose maciça em animais normais. Para Houssay & Sordelli loc. cit. a absorção lenta do veneno inoculado por via sub-cutânea, provocaria a diminuição ou o desaparecimento do fibrinogênio sangüíneo.

Vellard (1938), trabalhando com o veneno de *Bothrops atrox* da Venezuela, confirma os achados de Houssay et al (locs. cits.); chama a atenção para o fato de que para o cão e o coelho o veneno por via venosa produz fase extremamente curta de elevação da coagulabilidade sangüínea exatamente no instante da injeção; logo após, o sangue torna-se incoagulável pelo desaparecimento do fibrinogênio (no cão pudemos pelo estudo dos dados do autor calcular em cerca de 0,18 mg/Kg a dose produtora de tal efeito).

Rosenfeld et al (1958) titularam o fibrinogênio no envenenamento botrópico experimental em cães e também, pela primeira vez na literatura, em casos humanos de picadas acidentais; em todos os casos, no cão e no homem, havia uma incoagulabilidade sangüínea e, simultaneamente, grande decréscimo dos valores do fibrinogênio. Na fase experimental, em cães, 0,2 mg/Kg de veneno de *Bothrops jararaca* constituiu a dose encontrada para se obter a "eliminação experimental do fibrinogênio".

O conhecimento do fato de se obter a incoagulabilidade sangüínea "in vivo" com pequenas doses de venenos coagulantes é de suma importância para o nosso trabalho atual, pois que poderíamos determinar as condições em que o fenômeno pudesse ser obtido no camundongo e nos utilizaríamos dele como artifício para a determinação da DL50 a fim de confirmar a nossa hipóteses, preliminar (Furlanetto et al, 1973).

Tais considerações levaram-nos, pois, à suposição de que deveria ser possível o encontro de dose de veneno botrópico capaz de, quando injetado por via venosa em todos os camundongos de um lote a ser ensaiado, produzir efeito protetor contra as mortes imediatas por doses mais elevadas de veneno, injetadas numa segunda fase.

A dose prévia procurada, segundo essa concepção, deveria não apenas ser capaz de suprimir a coagulabilidade sangüínea, supostamente a principal causa de morte imediata, como também, obviamente, ser razoavelmente tolerada pelo camundongo.

Para abordar esse problema deveríamos determinar, inicialmente, o tempo normal de coagulação sangüínea na linhagem de camundongos mantida pelo

Instituto Butantan. Isto feito, poderíamos injetar doses variáveis de um veneno altamente coagulante, a fim de procurar aquela que, não causando morte, tornasse o sangue incoagulável.

Encontrada essa dose preparatória, o problema seguinte seria o de verificar sua aplicabilidade ao problema da determinação da DL50 a fim de revelar outros fatores tóxicos do veneno. Siles Villarroel et al (1973) mostraram a ocorrência de 9 a 15 componentes eletroforéticos nos venenos de várias espécies de *Bothrops.*

MATERIAL E MÉTODOS

Venenos utilizados:

Os venenos com os quais trabalhamos bem como seu método de conservação e utilização foram aqueles descritos em trabalho anterior (Furlanetto et al, 1973).

Veneno de **Bothrops moojeni**: **B. moojeni** (F)

No desenvolvimento deste trabalho surgiu a conveniência de se eleger pela potência coagulante um veneno botrópico, para ser utilizado em repetidos ensaios. A seleção recaiu em determinada amostra de veneno de *B. moojeni* cuja Dose Mínima Coagulante (D.M.C.) era de 0,4 μg. Com esse veneno foi então preparada uma solução contendo 400 μg/ml que depois de distribuida em "flaconetes" que foram hermeticamente fechados, foi conservada no congelador a -25°C. Esse material passou a ser designado como veneno de *B. moojeni* (F). No momento do uso era descongelado um "flaconete" sob água corrente e então preparadas as diluições necessárias em solução fisiológica (0,85% de NaCl); os eventuais excedentes eram desprezados.

Animais

Foram utilizados camundongos de 18 a 22g, sem distinção de sexo, todos provenientes do Biotério Geral do Instituto Butantan; as inoculações eram feitas por via venosa.

Determinação da Dose Mínima Coagulante (D. M. C.) ou Unidade Coagulante (U. C.)

A Dose Mínima Coagulante é uma unidade arbitrária por nós introduzida para ponto de referência de atividade coagulante, quer de venenos, quer de produtos coagulantes deles derivados. O esquema técnico foi tomado de Houssay et al (1917/1918); essa unidade pode ser assim conceituada: chamamos D.M.C. ou U.C. a quantidade de veneno dissolvido depois de seco que, no volume de 0,2 ml é capaz de promover a coagulação, entre 8 a 10 minutos e a



37°C, de 1,0 ml de plasma normal de cavalo, adicionado de 2‰ de oxalato de potássio (o plasma deve ser colhido no dia do ensaio).

O teste para essa determinação era conduzido em tubos de ensaio de 14 mm X 14 cm, imersos em banho-maria a 37°C e considerava-se o plasma coagulado quando se formava bloco de fibrina capaz de escorregar pela parede do tubo quando este era inclinado.

Determinação da Dose Mínima Mortal (D.M.M.)

A expressão D.M.M. conveciona-se como dose "certamente" letal para o pombo de 280 a 320 g, por inoculação endovenosa segundo o método de Vital Brazil (1907).

Determinação do tempo de coagulação do sangue de camundongos

Com tesoura bem afiada, cortava-se de golpe, cerca de 1,5 a 2,0 cm da extremidade da cauda; sem espremer, colhia-se a gota de sangue que fluía normalmente, sobre lâmina quimicamente limpa e iniciava-se a contagem do tempo pondo-se a funcionar um cronômetro. Decorrido o tempo de 1,0, 1,5 e 2,0 minutos e, a seguir, cada 15 segundos, praticava-se o teste de coagulação da gota de sangue. Tal teste era feito com o biséu de agulha hipodérmica bem fina: procurava-se levantar cuidadosamente parte da gota; quando aparecesse um nítido fio de fibrina ligando a gota ao bisél da agulha, considerava-se o sangue coagulado e marcava-se o tempo.

Outras determinações

Sempre que trabalhávamos com outro material, as técnicas utilizadas foram rigorosamente aquelas citadas pelos autores respectivos e cuja referência se encontra no texto.

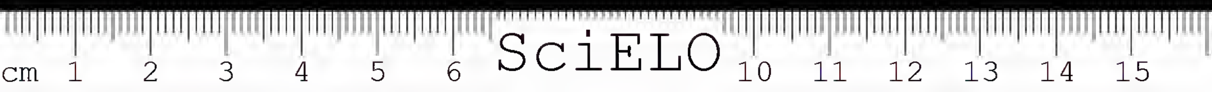
Em dadas experimentações onde eram introduzidas pequenas alterações técnicas, estas constam de anotações em separado.

RESULTADOS

Para a seqüência experimental havia a necessidade da determinação prévia do tempo de coagulação do sangue de camundongos normais e também daqueles que recebessem uma dose sub-letal do veneno em questão. Para isso tomaram-se 190 camundongos normais de 18 a 22 g de peso, os quais foram separados ao acaso em 19 lotes.

Um desses lotes constituiu o testemunho, isto é, serviu para determinação do tempo médio normal de coagulação sangüínea.

Os 18 lotes restantes foram submetidos a inoculações endovenosas com o veneno de *B. moojeni* (F), cujas especificações se encontram no capítulo



Material e Métodos. Esses lotes foram assim destinados: seis deles, para inoculação com 1 μg de veneno; outros seis lotes com 2 μg e os restantes, com 4 μg.

Para cada uma dessas doses de veneno havia, portanto, seis lotes de 10 animais, permitindo a determinação do tempo de coagulação em seis tempos diferentes, a contar do momento da inoculação. Na Tabela I estão sumariados os resultados, que representam valores médios do tempo de coagulação em cada um dos lotes.

TABELA I

Determinação do tempo de coagulação do sangue de camundongos normais e procura da dose de veneno que inoculada por via venosa determinasse a incoagulabilidade. Cada dose estava contida em 0,5 ml e era inoculada por via venosa em animais de 18 a 22 g. Veneno de B. moojeni *(F).*

Dose de veneno em μg	Tempo, em minutos, decorrido após aplicação do veneno	Média * do tempo de coagulação em minutos	Observações
0	0	1,50	Lote testemunha
1,0	5	1,40	
	15	1,30	
	30	2,20	
	60	2,15	
	120	2,20	
	240	1,50	
2,0	5	1,30	
	15	3,30	
	30	3,15	
	60	5,15	Dois animais com sangue não coagulável **
	120	4,10	Oito animais com sangue não coagulável **
	240	2,25	
4,0	5		Tempo de coagulação não determinado neste lote, visto terem ocorrido 20% de mortes imediatas.
	15		
	30		
	60		
	120		
	240		

* Média computada apenas entre os animais em que o sangue permanecia coagulável.

** O tempo de observação se extendia até o início de dessecação do material, o que ocorria geralmente ao redor de 10 minutos.

O exame da Tabela I demonstra que a dose de 4μg é excessiva, uma vez que produziu cerca de 20% de mortes imediatas.

No que diz respeito à dose de 2 μg, já a partir de 15 minutos após a inoculação, observa-se elevação do tempo de coagulação, que atingiu valor máximo no lote testado duas horas após a inoculação do veneno, quando oito dos dez animais inoculados permaneceram mais de 10 minutos com sangue incoagulável; quatro horas após a inoculação observou-se nítida tendência de volta ao tempo normal de coagulação. É de se notar ainda a não ocorrência de mortes com esta dose.

Finalmente, em relação a dose de 1 μg observou-se ligeiro aumento do tempo de coagulação desde meia até duas horas após a inoculação; não se registraram mortes.

Os dados apresentados (Tabela I) indicam, pois, que a dose procurada encontra-se entre 2 e 4 μg, uma vez que esta última dose levou alguns animais à morte e que com a primeira, nas observações feitas uma e duas horas após a inoculação, muitas amostras de sangue secavam sem coagular.

O fato de que determinada dose do veneno *B. moojeni* (F), produzia a incoagulabilidade do sangue de camundongos e não tivesse provocado mortes imediatas ou tardias levou-nos a ensaiá-la experimentalmente como dose preparatória (D. P.), isto é, dose que, causando fase de incoagulabilidade sangüínea temporária, pudesse eventualmente proteger camundongos de mortes imediatas, frente a elevadas doses do mesmo veneno. Por essa razão, 2 μg de veneno *B. moojeni* (F), foi ensaiada por via venosa na experiência constante da Tabela II, e duas horas após, tempo no qual o lote de camundongos assim tratados deveria estar em fase de incoagulabilidade sangüínea, foram aplicadas doses de veneno capazes de provocar a morte imediata de animais não tratados.

TABELA II

Determinação da zona de toxicidade do veneno de B. moojeni *em animais tratados com a dose preparatória prévia (D.P.) duas horas antes da inoculação das doses tóxicas. Cada dose estava contida em 0,5 ml e era inoculada por via venosa em camundongos de 18 a 22 g. Como D. P. foram usados 2μg do próprio veneno de* B. moojeni *(F).*

Dose de veneno em μg	Animais normais — sem D.P — Tempo de observação				Animais tratados — com D.P. — Tempo de observação			
	10min.	60min.	24h	48h	10min.	60min.	24h	48h
5	3/10	6/10	6/10	6/10	0/10	0/10	0/10	0/10
10	8/10	8/10	8/10	8/10	0/10	0/10	0/10	0/10
20	8/10	10/10	—	—	0/10	0/10	0/10	0/10
40	9/10	10/10	—	—	0/10	0/10	0/10	0/10
80	10/10	—	—	—	0/10	0/10	0/10	0/10
160	10/10	—	—	—	7/10	8/10	10/10	—

FURLANETTO, R. S., ROLIM ROSA, R., SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758. II — Possibilidade de determinação da DL50 através da inoculação prévia de doses infra-letais do próprio veneno. *Mem. Inst. Butantan*, 37: 109-122 1973.

TABELA III

Determinação da DL50 pelos limites de doses fornecidos pelo experimento constante da Tabela II com D.P. do mesmo veneno de B. moojeni *aplicado 2 hroas antes da inoculação das doses tóxicas.*

Dose de veneno em µg	Animas normais — sem D.P.				Animais tratados — com D.P.			
	Tempo de observação				Tempo de observação			
	10min.	60min.	24h	48h	10min.	60min.	24h	48h
80,0	10/10				0/10	0/10	1/10	1/10
89,6	10/10				0/10	1/10	3/10	3/10
100,8	10/10				0/10	2/10	4/10	4/10
112,8	n.i. *				0/10	1/10	7/10	7/10
126,4	n.i.				0/10	4/10	7/10	7/10
142,4	n.i.				2/10	5/10	10/10	—
160,0	n.i.				4/10	9/10	10/10	—

* n.i. = não inoculado por ser considerado desnecessário.

DL50 = 104 µg em 24 horas (calculada pelo método de Reed & Müench, 1938).

TABELA IV

Determinação da DL50 do veneno de B. moojeni *pelos limites das doses fornecidos pelos experimentos constantes da Tabela II com D.P. do mesmo veneno de* B. moojeni *aplicado 4 horas antes da inoculação das doses tóxicas.*

Dose de veneno em µg	Tempo de observação			
	10min.	60min.	24h	48h
80,0	1/10	1/10	4/10	4/10
89,6	2/10	2/10	4/10	4/10
100,8	1/10	5/10	6/10	6/10
112,8	2/10	7/10	8/10	9/10
126,4	1/10	4/10	8/10	8/10
142,4	2/10	8/10	8/10	8/10
160,0	5/10	9/10	10/10	—

DL50 em 24 horas = 97µg.

Todo método de avaliação de atividade deve, como condição fundamental, fornecer resultados coerentes em ensaios repetidos. Por essa razão, resolvemos repetir o ensaio da Tabela III em dias diferentes; tivemos o cuidado de partir sempre da mesma solução de veneno de *B. moojeni* (F) (400 µg/ml) guardada no congelador em vários "flaconetes", sendo sempre descongelado um, no dia do ensaio.

FURLANETTO, R. S., ROLIM ROSA, R., SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758. II — Possibilidade de determinação da DL50 através da inoculação prévia de doses infra-letais do próprio veneno.
Mem. Inst. Butantan, 37: 109-122 1973.

TABELA V

Repetição da determinação da DL50 pelos limites de doses fornecidos pelo experimento constante da Tabela II com D. P. do próprio veneno de B. moojeni *(2 µg) aplicado duas horas antes da inoculação das doses tóxicas. Ensaio repetido cerca de um mês após.*

Dose de veneno em µg	Tempo de observação			
	10min.	60min.	24h	48h
80,0	0/10	0/10	1/10	1/10
89,6	0/10	1/10	2/10	2/10
100,8	0/10	2/10	6/10	6/10
112,8	0/10	3/10	9/10	9/10
126,4	0/10	1/10	7/10	7/10
142,4	1/10	3/10	9/10	10/10
160,0	3/10	5/10	10/10	—

DL50 = 100,8 µg em 24 horas.

TABELA VI

Repetição da determinação da DL50 com D. P. do próprio veneno de B. moojeni *(2 µg) aplicado duas horas antes da inoculação das doses tóxicas. Ensaio realizado cerca de 60 dias após a realização do ensaio constante da Tabela III.*

Dose de veneno em µg	Tempo de observação			
	10min.	60min.	24h	48h
80,0	0/7	1/7	2/7	2/7
89,6	0/7	1/7	2/7	2/7
100,8	0/7	1/7	2/7	2/7
112,8	0/7	0/7	2/7	2/7
126,4	1/7	3/7	7/7	—
142,4	0/7	3/7	7/7	—
160,0	4/7	5/7	7/7	—

DL50 = 107,05 µg em 24 horas

DISCUSSÃO

Os ensaios constantes das Tabelas II, III, V e VI mostram flagrante deslocamento dos níveis letais para valores muito mais altos nos animais tratados com D.P. Poderíamos estimar a DL50 nos animais normais como sendo próxima de 5 µg, enquanto que nos animais tratados oscilou entre os valores de 104, 100 e 107 µg. Tendo-se em mente que os tres ensaios foram feitos em datas diferentes, é evidente a coerência entre elas.

As mortes imediatas, consistentemente observadas nos lotes sem D.P., com todas as doses de veneno, desapareceram nos animais com D.P., para reaparecerem somente com doses de veneno muito elevadas e muito acima da DL50 calculada. Ademais, pela análise das Tabelas III, V e VI verifica-se nítida elevação do número de mortes, em função do prolongamento do tempo de observação, nos animais tratados com D. P.

A Tabela IV sugere que o efeito da D.P. tenha diminuido após quatro horas, coerentemente com os dados constantes da Tabela I, pois reapareceram as mortes imediatas.

Não há dúvida, pois, que uma única dose adequada de veneno, aplicada duas horas antes, pode proteger contra morte imediata por doses de veneno capazes de matar todos os animais não tratados, e, possibilita o cálculo da DL50 com consistente reprodutibilidade.

Se admitirmos que as mortes dos animais normais, observáveis nos 10 minutos seguintes à inoculação de pequenas doses de veneno, ocorrerem por conta da formação de microcoágulos, parece evidente que este mecanismo de morte é prevenido pela D.P.

Quando o intervalo entre a D.P. e a aplicação das doses tóxicas foi de quatro horas (Tabela IV) a D.P. já não forneceu a mesma proteção o que pode ser interpretado como conseqüência da tendência do tempo de coagulação voltar a se normalizar conforme demonstra os dados constantes da Tabela I.

Particular menção deve ser feita às mortes imediatas em 10 minutos que podem ocorrer nos animais tratados com D.P. após a inoculação de doses muito elevadas de veneno, maiores que 142 μg (Tabelas III, V e VI). Especial atenção merece também o registro do fato que, a partir de doses não tão elevadas de veneno (89,6 μg), aparecem mortes em 60 minutos. Ora, as mortes com elevadas doses de veneno quer em 10 minutos quer em 60 minutos, não mais parecem ser atribuíveis à coagulação intravascular. Realmente, como demonstrou Rosenfeld et al (1958) o sangue, tornado incoagulável por inoculação de veneno botrópico por via venosa, leva mais de quatro horas para recuperar a coagulabilidade. Tal resultado parece ser confirmado pelos dados constantes da Tabela I. Parece, pois, que a D.P. permite evidenciar, nesta altura, dois mecanismos de morte do animal:

1.º) animais não tratados que morrem provavelmente por coagulação intravascular que seria evitável pela D.P.;

2.º) animais que receberam a D.P. e ficaram, portanto, pela incoagulabilidade sangüínea protegidos contra aquele primeiro mecanismo de morte, mas não ficaram protegidos contra o segundo mecanismo de morte rápida que se verifica com altas doses de veneno e somente evidenciável de modo nítido por intermédio da D.P.

Tal concepção encontra apoio nos trabalhos de Arthus (1913) que, tendo imunizado coelhos contra o fator coagulante de alguns venenos, verificou que

animais assim tratados, quando inoculados por via venosa com altas doses de veneno, não sofriam coagulação intravascular maciça mas sim um choque, denominado pelo autor de "choque proteotóxico"; este se caracterizava, essencialmente, pela queda abrupta da pressão arterial, taquipnéia e morte; tal fenomenologia foi atribuida a uma substância incoagulante que seria liberada pela ação do veneno sobre o fígado.

A evidência de que os animais que recebem veneno botrópico por via venosa podem sofrer choque tipo anafilactóide, por liberação de várias substâncias farmacologicamente ativas, tem sido mencionada insistentemente na literatura. Assim, Houssay et al (1922), trabalhando com os venenos botrópicos por via venosa em cães e utilizando doses incapazes de produzir morte imediata, observaram forte abaixamento da pressão arterial, acompanhada de taquipnéia, que chamaram também de "choque proteotóxico". Vellard et al (1941) reestudaram o assunto e, no coelho, obtiveram com doses apropriadas de veneno de *Bothrops atrox* (hoje classificada como *B. moojeni*) um choque caracterizado por queda brusca da pressão arterial, taquipnéia, coma e congestão pulmonar e intestinal; tais fenômenos poderiam provocar a morte do animal ou então desaparecer rápida e completamente.

Schöttler (1955/1956) descreveu também um choque no camundongo com "*altas doses*" de veneno botrópico; esse choque poderia provocar a morte em "poucos minutos" ou produzir um "coma profundo" que também poderia levar à morte, ou então permitir a recuperação total dos animais.

Tais choques anafilactóides são normalmente interpretados pela liberação de substâncias farmacologicamente ativas pelos enzimas do veneno (Feldberg & Kellaway, 1937 e 1938; Zeller, 1948; Rocha e Silva, Beraldo & Rosenfeld, 1949; Essex & Markowitz, 1930; Werle, Kehl e Koebke, 1950).

Os resultados por nós obtidos, relacionados aos dados da literatura mencionados, levaram-nos a admitir que a D.P. protege contra a morte imediata por coagulação intravascular, mas não protege contra a morte pelo "choque proteotóxico", de Arthus, de Houssay e outros. Com altas doses de veneno, pode-se mesmo obter o segundo mecanismo de morte "choque anafilactóide" ou "proteotóxico" com maior evidência, evitando-se o primeiro mecanismo através da D.P. Os animais que não sucumbem ao choque anafilactóide poderão apresentar intoxicação tardia (24 horas), como terceiro mecanismo de morte.

Para o objetivo precípuo deste trabalho, isto é, o encontro de um método prático para avaliar a DL50 de venenos botrópicos, o segundo mecanismo de morte não influencia substancialmente os resultados, pois ocorre de modo mais freqüente somente com doses de veneno mais elevadas do que a DL50 calculada (Tabelas III, V e VI).

CONCLUSÕES

1. A inoculação de doses relativamente pequenas de veneno de *B. moojeni*, por via venosa em camundongos, provocam mortes dentro de 10 minutos (mortes imediatas), sendo impossível avaliar sua DL50.

2. A inoculação por via venosa em camundongos de determinadas doses infra-letais (D.P.) de veneno de *B. moojeni,* leva a uma incoagulabilidade sangüínea que atinge o seu máximo efeito duas horas após. A partir desse tempo, parece haver uma tendência à normalização do tempo de coagulação.

3. Camundongos tratados com a D.P. do próprio veneno suportam duas horas após, elevadas doses do mesmo veneno sem que ocorram fenômenos de "mortes imediatas", o que sugere que estas mortes imediatas ocorram por coagulação intravascular.

4. Doses preparatórias de veneno (D.P.) capazes de proteger os camundongos contra as mortes imediatas (dentro de dez minutos) conseqüentes a inoculação endovenosa de outras doses maiores, tem esse poder correlacionado com o aumento do tempo de coagulação ou com a fase de incoagulabilidade sangüínea por elas provocadas.

5. Camundongos tratados com D.P. inoculados com doses maciças do mesmo veneno, acima dos valores da DL50, podem sucumbir em 10 minutos o que leva a pressupor que neste caso, tais mortes ocorram por um mecanismo diferente da coagulação intravascular, tratando-se possivelmente de um "choque proteotóxico" ou "anafilactóide".

6. Os animais escapos da morte imediata através da proteção conferida pela D.P. e que sobrevivam também ao "choque proteotóxico", ao receberem elevadas doses de veneno, poderão apresentar intoxicação tardia (24 horas) como terceiro mecanismo de morte pelo veneno botrópico.

7. Doses escalonadas de veneno de *B. moojeni,* inoculadas em camundongos previamente tratados com D.P. do mesmo veneno, permitem avaliar com reprodutibilidade altamente satisfatória sua DL50.

SUMMARY — The authors demonstrated that the inoculation of determinate sublethal doses (P.D) of *Bothrops* venom by intravenous route in mice brings the blood to a non-coagulation whose apex is reached two hours later.

Animals treated in this way tolerate high doses of the same venom without the occurrence of immediate death attributable to intravascular coagulation. This permits the estimation of the LD50 of the venom, in condition of satisfactory reproducibility. The same technology has allowed the characterization of two other death mechanisms due to the action of high doses of venom: "proteotoxic shock" or anaphylactoid, and delayed intoxication, independently of the two first mechanisms.

UNITERMS — *Bothrops* venom; LD50 determination of *Bothrops* venom; blood non-coagulation by *Bothrops* venom; death mechanisms due to the action of *Bothrops* venom.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARTHUS, M. apud HOUSSAY, B. A. & SORDELLI, A. — Action des venins de serpents sur la coagulation sanguine. *J. Phisiol. Pathol. Génér.,* 18: 781-811, 1920.

2. ARTHUS, M. — Venoms of serpents. III. Coagulating venoms and anaphylaxis. *Arch. Inter, Physiol.,* Liege, 12: 369-393, 1913.

3. BRAZIL, V. — A sorotherapia do ophidismo em relação à distribuição geográfica das serpentes. *Rev. Med. S. Paulo*, 10 (22): 457-462, 1907.

4. BRAZIL, V. & RANGEL PESTANA, B. — Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. V. Ação physiologica. *Rev. Med. S. Paulo*, 12 (21): 415-425, 1909.

5. ESSEX, H. E. & MARKOWITZ, J. — The physiologic action of rattlesnake venom (crotalin). VII. The similarity of crotalin shock and anaphylatic schock. *Amer. J. Physiol.*, 92: 698-704, 1930.

6. FELDBERG, W. & KELLAWAY, C. — Liberation of histamine from the perfused lung by snake venoms. *J. Physiol.*, 90: 257-279, 1937.

7. FELDBERG, W. & KELLAWAY, C. — Liberation of histamine and formation of lyisocithin-like substances by cobra venoms. *J. Physiol.*, 94: 187-226, 1938.

8. FONTANA, F. — Traité sur le venin de la vipera, sur les poisons americains, sur le lamier-cerise et sur quelquer autres poisons végètaux, vol. I e II, Florence, 1781.

9. FURLANETTO, R. S., ROLIM ROSA, R., SILES VILLARROEL, M. & SIRACUSA, Y. Q. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos. I. Fenómenos que ocorrem na tentativa de determinação da DL50. *Mem. Inst. Butantan*, 1973 (no prelo).

10. HOUSSAY, B. A. & SORDELLI, A. — Estudios sobre los venenos de serpientes. V Influêneia de los venenos de serpientes sobre la coagulación de la sangre. *Rev. Inst. Bact.*, Buenos Aires, 1 (5): 485-564, 1917/18.

11. HOUSSAY, B. A., SORDELLI, A. & NEGRETE, J. — Estudios sobre los venenos de serpientes. V. Influencia de los venenos de serpientes sobre la coagulación de la sangre. II. Acción de los venenos coagulantes. *Rev. Inst. Bact.*, Buenos Aires, 1 (5): 565-616, 1917/18.

12. HOUSSAY, B. A. & SORDELLI, A. — Action of snake venom on the coagulation of blood. *J. Physiol., Pathol. Gener.*, 18: 781-811, 1920.

13. HOUSSAY, B. A., OTERO, M. J., NEGRETE, J. & MAZZOCCO, P. — Action des venins coagulants de serpents sur le sang. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, 86: 411-412, 1922.

14. LACERDA FILHO — Investigações experimentais sobre a ação do veneno da *Bothrops jararaca* (serpent fer de lance du Brésil). *Arch. Museu Nac. Rio de Janeiro*, 2: 1-17, 1877.

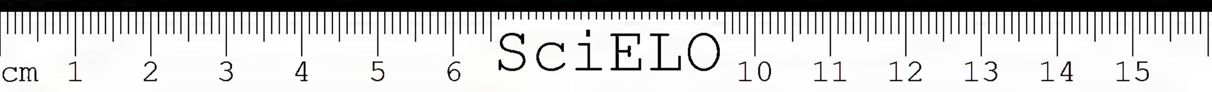
15. NOC, F. — On some physiological properties of different snake venoms. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 18: 387-406, 1904.

16. REED, L. J. & MUENCH, H. — A simple method of stimating fifty per cent end points. *Amer. J. Hyg.*, Baltimore, 27: 493-497, 1938.

17. ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T. & ROSENFELD, G. — Bradykinin, a hipotensive and smoth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Amer. J. Physiol.*, Washington, 156: 261-273, 1949.

18. ROSENFELD, G.; KELEN, E. M. A. & NAHAS, L. — Regeneration of fibrinogen after defibrination of bothropic venom in man and in dogs. Relationship with clotting and bleeding time. *Rev. Clin. S. Paulo*, 34: 36-44, 1958.

19. SAMARTINO, S. apud KLOBUSITZKY, D. — Coagulant and anticoagulant agents in snake venoms. *Amer. J. Med. Sci.*, 242 (1): 147-163, 1961.



20. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; FURLANETTO, R. S. & ZELANTE, F. — Estudo eletroforético em "cellogel" de venenos do gênero *Bothrops*. *Mem. Inst. Butantan*, 1973 (no prelo).

21. SCHÖTTLER, W. H. A. — Toxicity of the principal snake venoms of Brazil. *Amer. J. trop. Med.*, **31**: 489-499, 1951.

22. SCHÖTTLER, W. H. A. — Aspectos metodológicos da titulação de soros anti-peçonhentos. *Mem. Inst. Butantan*, **26**: 249-256, 1954.

23. SCHÖTTLER, W. H. A. — Serological analysis of venoms and antivenins. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **12**: 877-903, 1955.

24. SCHÖTTLER, W. H. A. — Observações miscelâneas sobre peçonhas ofídicas e antivenenos. *Mem. Inst. Butantan*, **27**: 73-83, 1955/56. ,

25. VELLARD, J. & HUIDOBRO, F. — Snake venoms and arterial pressure. III. Protection phenomena. *Rev. Soc. arg. Biol.*, **17**: 477-483, 1941

26. VELLARD, J. — Properties of the venoms of the principal species of venezuelan snakes. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, **60**: 511-548, 1938.

27. WERLE, E.; KEHL, R. & KOEBKE, D. — Ueber bradkyn, Kallidin und Hipertensin. *Biochem. — Z*, Berlim, **320**: 373-383, 1950.

28. ZELLER, E. A. — Enzymes of snakes-venoms and their biological significance. *Advan. Enzymol.*, New York, **8**: 459-495, 1948.

Recebido para publicação em 15.VI.73.

Aceito para publicação em 15.VIII.73.



Mem. Inst. Butantan
37: 123-129, 1973

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA DETERMINAÇÃO DA DL50 DE VENENOS BOTRÓPICOS INOCULADOS POR VIA VENOSA EM CAMUNDONGOS — *Mus musculus* Linnaeus, 1758.

III. POSSIBILIDADE DE DETERMINAÇÃO DA DL50, ATRAVÉS DA PROTEÇÃO CRUZADA CONFERIDA POR DOSES INFRA-LETAIS DE OUTROS VENENOS DE SERPENTES DO MESMO GÊNERO.

REYNALDO SCHWINDT FURLANETTO *
RAYMUNDO ROLIM ROSA **
MEDARDO SILES VILLARROEL,***
JOSÉ NAVAS ****

RESUMO — Os autores demonstraram que doses infra-letais de um veneno botrópico pode prevenir a ocorrência de mortes imediatas dos animais, quando da inoculação duas horas após, de doses maciças de veneno de serpentes do mesmo gênero, porém, de espécies diferentes (*B. moojeni, B. jararaca* e *B. neuwiedi*), possibilitando a determinação da DL50 de um deles mediante dose preparatória (D.P.) de outro. Demonstraram duas possibilidades: a) eleger-se um veneno altamente coagulante como padrão para obter o efeito de dose preparatória (D. P.); b) para os venenos das espécies de *Bothrops* mencionadas pode obter-se o mesmo efeito com 2 μg do próprio veneno.

UNITERMOS — Veneno botrópico; DL50 de venenos botrópicos; proteção cruzada com venenos botrópicos.

INTRODUÇÃO

A inoculação intravenosa de doses infra-letais de veneno botrópico em camundongos, torna estes animais extraordinariamente resistentes à inoculação, duas horas após, de elevadas doses do próprio veneno sem ocorrer as "mortes imediatas" (em 10 min.). As doses prévias (D. P.), acima referidas, levam a uma incoagulabilidade sangüínea que atinge o seu máximo efeito cerca de duas horas após a inoculação (Furlanetto et al 1973b). Nesse trabalho foi demonstrado que 2 μg de veneno de *B. moojeni* aplicado duas horas antes de elevadas doses escalonadas do mesmo veneno, permite avaliar com reproduti-

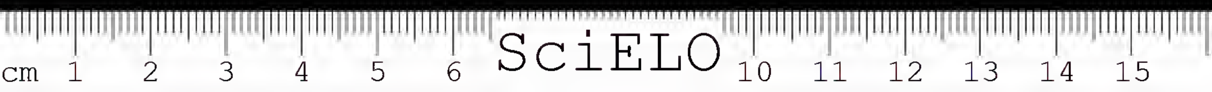
* Ex-Chefe da Secção de Imunoterapia do Instituto Butantan. Atual Professor Catedrático do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan. Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

*** Ex-Assistente do Setor de Soros Antipeçonhentos do Instituto Butantan. Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

**** Encarregado do Setor de Imunização do Instituto Butantan.

Endereço para correspondência:
C.P. 4365, São Paulo, Brasil:



bilidade satisfatória sua DL50. As doses infra-letais provocariam a destruição do fibrinogênio devido ao próprio "fator ou fatores coagulantes" do veneno em questão (Furlanetto 1965 e Furlanetto et al 1973b).

Se partíssimos agora da hipótese segundo a qual a fração coagulante dos diferentes venenos botrópicos teria natureza identica ou semelhante, variando mais quantitativa do que qualitativamente entre as espécies, o ensaio cruzado de D.P. de veneno de uma espécie de *Bothrops* poderia ser utilizada para o cálculo da DL50 de outro veneno do mesmo gênero.

MATERIAL E MÉTODOS

Venenos

Os venenos com os quais trabalhamos, bem como seu método de conservação e utilização foram aqueles descritos por Furlanetto et al (1973a).

Animais

Trabalhamos com camundongos de 18 a 22g, sem distinção de sexo, todos provenientes do Biotério Geral do Instituto Butantan; as inoculações eram sempre feitas por via venosa.

Outras especificações

Sempre que trabalhávamos com outro material, as técnicas utilizadas foram rigorosamente aquelas citadas pelos autores respectivos e cuja referência se encontra no texto. O veneno aqui citado como de *B. moojeni* (F) é o mesmo referido em trabalho anterior (Furlanetto et al 1973b).

RESULTADOS

Usando D.P. do veneno *B. moojeni* (F) e D.P. de um veneno de *Bothrops jararaca* ensaiamos a determinação da DL50 deste último. As características experimentais encontram-se sumariadas na Tabela I.

Empregamos veneno de *Bothrops jararaca* com D.M.M. = 30 μg (Método de Vital Brazil, 1909). Foi feita uma solução contendo 400 μg/ml distribuida em "flaconetes" e mantida no congelador a -25°C. No momento do uso era descongelado sob água corrente um "flaconete" e o material excedente não era aproveitado, tudo como para o veneno *B. moojeni* (F).

TABELA I

Determinação da DL50 de veneno de Bothrops jararaea *sem D.P., com D. P. do mesmo veneno e com D.P. de veneno* B. moojeni *(F), em camundongos de 18 a 22 g, inoculados por via venosa.*

Veneno de *B. jararaca* em µg	a) sem D.P.				b) com D.P. — 2 µg de veneno de *B. jararaca*				c) com D.P. — 2 µg de *B. moojeni* (F)			
	Tempo de observação				Tempo de observação				Tempo de observação			
	10min.	60min.	24h	48h	10min.	60min.	24h	48h	10min.	60min.	24h	48h
25,0	2/10	2/10	5/10	—	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
28,0	0/10	1/10	9/10	—	0/10	1/10	2/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10
31,5	2/10	3/10	8/10	—	0/10	0/10	2/10	2/10	0/10	0/10	1/10	1/10
35,3	3/10	3/10	8/10	—	0/10	0/10	3/10	3/10	0/10	0/10	2/10	2/10
39,5	4/10	4/10	10/10	—	0/10	0/10	3/10	3/10	0/10	0/10	2/10	2/10
44,5	7/10	7/10	10/10	—	0/10	0/10	8/10	9/10	0/10	0/10	7/10	7/10
50,0	3/10	6/10	10/10	—	0/10	0/10	10/10	—	0/10	0/10	8/10	9/10
					DL50 *	24h = 39,0 µg 48h = 38,5 µg			DL50	24h = 42,1 µg 48h = 41,8 µg		

* DL50 calculada pelo método de Reed & Müench (1938).

A análise dos valores expressos pela Tabela I demonstra que a D.P. com veneno de *Bothrops moojeni*, atuou de modo semelhante à D.P. do próprio veneno de *Bothrops jararaca*. Em ambos os protocolos *b* e *c* desapareceram as mortes imediatas que ocorrem indiscriminadamente nos animais sem D.P. já anteriormente assinaladas por Furlanetto et al (1973a). Aparecem nitidamente as mortes tardias em 24 horas com as maiores doses de veneno, e o resultado com 48 horas praticamente não se altera; a DL50 nos dois protocolos, é muito semelhante.

Embora se saiba que o veneno de *B. jararaca* é de menor potencia coagulante que o de *B. moojeni* (Rosenfeld et al 1959), utilizamos arbitrariamente para aquele o mesmo valor de D.P., determinado experimentalmente para este (Furlanetto et al, 1973b), com resultados práticos identicos.

A seguir decidimos verificar a possibilidade de proteção cruzada entre o veneno de outras espécies diferentes. Usando D.P. do veneno *B. moojeni* (F), D.P. do de *Bothrops jararaca* e D.P. do de *Bothrops neuwiedi*, ensaiamos a determinação da DL50 deste último veneno. As características experimentais foram semelhantes aos da Tabela I e os resultados encontram-se sumariados na Tabela II.

DISCUSSÃO

A análise dos resultados evidencia a possibilidade de emprego de D.P. de um veneno botrópico altamente coagulante (*B. moojeni*) para o cálculo da DL50 de outros venenos de serpentes do mesmo gênero.

É bem de ver-se, na realidade, que se houvesse necessidade de procurar um efeito de D.P. de cada veneno, com os ensaios necessários relativos aos tempos de coagulação, conforme feito em trabalho anterior (Furlanetto et al, 1973b), a aplicação do método seria laboriosa e conseqüentemente este teria menor generalização.

Nesse sentido, caso a D.P. de um veneno permitisse o cálculo da DL50 do outro, poder-se-ia eleger um veneno padrão, decorrendo daí facilitação tecnológica altamente desejável.

Se fosse possível simplificar mais ainda a metodologia, o âmbito de influência do método seria grandemente ampliado. Esse raciocínio levou-nos a ensaiar, comparativamente, como D.P. para determinação da DL50 de um dado veneno, o próprio veneno em estudo, na quantidade identica àquela encontrada para o *B. moojeni* (F). Tal forma de procedimento emergia, também, do raciocínio dado pelos resultados do trabalho supra citado, pois talvez não fosse necessário obter-se uma fase de completa incoagulabilidade para se obter proteção, sendo suficiente, quiçá, conseguir-se uma dilatação de tempo de coagulação. Nessa ordem de idéias, o princípio coagulante do mesmo veneno a ser ensaiado poderia talvez promover dilatação suficiente do tempo de coagulação capaz de evitar as mortes imediatas por coagulação intravascular.

TABELA II

Determinação da DL50 de veneno de B. neuwiedi, *com D. P. do mesmo veneno, com D.P de* B. jararaca *e com D. P. de* B. moojeni *(F) em camundongos de 18 a 22 g, inoculados por via venosa.*

Veneno de *B. neuwiedi* em µg	a) com D. P. de *B. neuwiedi* — Tempo de observação				b) com D.P. de *B. jararaca* — Tempo de observação				Veneno de *B. neuwiepi* em µg	c) com D.P. de *B. moojeni* (F) — Tempo de observação			
	10min.	60min.	24h	48h	10min.	60min.	24h	48h		10min.	60min.	24h	48h
16,0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	40,0	0/10	1/10	1/10	1/10
20,2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	44,8	0/10	0/10	1/10	1/10
25,4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	50,4	0/10	0/10	2/10	2/10
32,0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	56,4	0/10	1/10	5/10	5/10
40,3	0/10	1/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	63,2	0/10	2/10	5/10	5/10
50,8	1/10	1/10	3/10	3/10	0/10	0/10	2/10	2/10	71,2	0/10	1/10	8/10	8/10
64,0	1/10	1/10	8/10	9/10	0/10	1/10	5/10	6/10	80,0	0/10	3/10	8/10	8/10
	DL50	24h = 55,4 µg 48h = 54,5 µg			DL50	24h = 61,6 µg 48h = 59,8 µg				DL50	24h = 59,8 µg 48h = 59,8 µg		

Novamente aqui, com D.P. de tres venenos de espécies diferentes de *Bothrops* houve supressão das mortes imediatas.. As tres DL50 são razoavelmente próximas

Com essas questões em mente foram conduzidas as experiências constantes do presente trabalho, cujos resultados nos permitem postular que realmente, determinada D.P. de um veneno pode prevenir morte imediatas capazes de resultar da inoculação de determinadas doses de outros venenos do mesmo gênero. Com efeito, o veneno *B. moojeni* (F) atuou como D.P. para venenos de *B. jararaca* e *B. neuwiedi*, permitindo homogeneidade das respostas e cálculo das DL50 respectivas. Tal resultado autoriza-nos a supor que o veneno *B. moojeni* (F) possa ter o mesmo efeito para os demais venenos do gênero *Bothrops* e, portanto, possa ele, ou outro que se demonstre superior, servir como padrão, caso assim seja considerado necessário. A comprovação, em maior escala, desta suposição alicerçada em nossa experiência, constitue trabalho de casuística em aberto.

Por outro lado, os resultados constantes das Tabelas I e II, evidenciam que a dose de 2 µg, tomada à semelhança do veneno *B. moojeni* (F), pode ter efeito de D.P., protegendo contra doses do próprio veneno capazes de provocar a coagulação intravascular maciça imediata. Esse fato auspicioso para a metodologia, demonstrado com venenos de *B. jararaca, B. moojeni* e *B. neuwiedi,* parece indicar talvez, que a dose que funcione como D.P. pode ser facilmente encontrada através de simples ensaios preliminares, sem necessidade de se repetirem as experiências até aqui realizadas: bastaria, talvez, ensaiar-se uma dose do próprio veneno, incapaz de promover mortes imediatas, para se obter o efeito de D.P. Por fim, aqueles resultados levaram ainda ao conceito de que as proteções obtidas de modo cruzado com venenos diversos, pudessem ser devidas, pelo menos em parte, a identidade do fator coagulante nos vários venenos ensaiados. Tal conceito encontra apôio nos trabalhos de Rosenfeld et al (1962) que demonstrou haver neutralização cruzada do poder coagulante por antisoros obtidos pela imunização com venenos do mesmo gênero, porém, de espécies diferentes.

CONCLUSÕES

1. A inoculação intravenosa de doses infra-letais (D.P.), de um determinado veneno botrópico previne a ocorrência de mortes imediatas dos animais quando da inoculação duas horas após, de doses maciças de outro veneno de serpentes do mesmo gênero.

2. Para os venenos botrópicos ensaiados (*B. moojeni, B. jararaca, B. neuwiedi*), a dose preparatória (D.P.) tendo efeito cruzado, permite determinar a DL50 de um, mediante dose preparatória de outro.

3. Pode-se eleger um veneno altamente coagulante como padrão para a D.P. para fins de cálculo da DL50 de outros venenos botrópicos.

4. Pode-se também usar o próprio veneno na dose de 2 µg para os fins colimados na conclusão anterior no caso dos venenos de *B. moojeni, B. jararaca* e *B. neuwiedi.*

FURLANETTO, R. S., ROLIM ROSA, R., SILES VILLARROEL, M. & NAVAS, J. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via da DL50, através da proteção cruzada conferida por doses intra-letais de outros venenos de venosa em camundongos — *Mus musculus* Linnaeas, 1758. III — Possibilidade de determinação serpentes do mesmo gênero.

Mem. Inst. Butantan, 37: 123-129, 1973.

SUMMARY — The authors demonstrated that sublethal doses of a *Bothrops* venom can prevent the occurrence of immediate death of the animals if two hours later these animals will receive massive venom doses of snakes that belong to the same genus, but to different species (*B. moojeni*, *B. jararaca* and *B. neuwiedi*).

It is possible to determine the LD50 of one of these venoms by means of a preparatory dose (P D.) of another.

The authors demonstrated two possibilities:

a) To select a standard venom with high coagulant power in order to obtain the preparatory dose effect (P. D.).

b) For the venoms of the mentioned *Bothrops* species it is possible to obtain the same effect with 2,0 μg of the very venom.

UNITERMS — *Bothrops* venom; LD50 of *Bothrops* venoms; cross protection with *Bothrops* venoms.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FURLANETTO, R. S. — *Emprego de camundongos tratados com doses preparatórias de venenos bothropicos para a avaliação de DL50 desses venenos.* São Paulo, 1965 /Tese — Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo/

2. FURLANETTO, R. S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & SIRACUSA, Y. Q. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculos* Linnaeus, 1758. I. Fenómenos que ocrrem na tentativa de determinação da DL50. (*Mem Inst. Butantan*) — no prelo, 1973a.

3. FURLANETTO, R. S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos *Mus musculus* Linnaeus, 1758. II. Possibilidade da determinação da DL50 através da inoculação prévia de doses infra-letais do próprio veneno. (*Mem. Inst. Butantan*), no prelo, 1973b.

4. REED, L. J. & MUENCH, H. — A simple method of estimating fifty per cent end points. *Amer. J. Hyg., Baltimore*, 27: 493-497, 1938.

5. ROSENFELD, G.; HAMPLE, O. G. & KELEN, E. M. A. — Coagulant and fibrinolytic activity of animals venoms; determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mem. Inst. Butantan*, 29: 143-163, 1959.

6. ROSENFELD, G.; KELEN, E. M. A. & NUDEL, F. — Neutralização cruzada do poder coagulante de venenos ofídicos com soros antivenenos. *Ciên. Cult.*, São Paulo, 14: 254-255, 1962.

Recebido para publicação em 15.VI.73.
Aceito para publicação em 15.VIII 73


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

Mem. Inst. Butantan
37: 131-137, 1973

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA DETERMINAÇÃO DA DL50 DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768), EM *Mus musculus* Linnaeus, 1758.

RAYMUNDO ROLIM ROSA *
SIRDÉIA MAURA PERRONE FURLANETTO **
MEDARDO SILES VILLARROEL***
FLÁVIO ZELANTE **

RESUMO — O emprego de camundongos — *Mus musculus* — permite o cálculo da DL50 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (crotamino-positivo) através de inoculação por via intravenosa. A aplicação de doses sub-letais, duas horas antes, não dessensibiliza o animal, conforme demonstrado pelo valor da DL50. A inoculação prévia de um veneno altamente coagulante (*B. moojeni*) em doses que levam à incoagulabilidade sangüínea (2 μg), não interfere no valor da DL50 do veneno crotálico.

UNITERMOS — Veneno crotálico; DL50 de veneno crotálico.

INTRODUÇÃO

Em trabalhos anteriores, em colaboração com Furlanetto et al (1973b, 1973c), foi demonstrado que era possível determinar a DL50 dos venenos botrópicos altamente coagulantes, mediante a aplicação prévia de pequena dose do veneno em estudo, ou de outros produzidos por espécies diferentes, porém, do mesmo gênero. A essa dose denominamos "dose preparatória" ou simplesmente D.P., demonstrando que a mesma provocava, em camundongos de 18 a 22g, inoculados por via intravenosa, uma incoagulabilidade sangüínea que atingia o máximo em uma a duas horas após sua aplicação, o que possibilitava a determinação da DL 50 desses venenos.

Propuzémo-nos, preliminarmente, a estudar, com a mesma metodologia adotada nos trabalhos anteriores, a determinação da DL50 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768). Trabalhamos com o veneno crotamino-positivo, de uma subespécie do gênero *Crotalus* Linnaeus, 1758, face à demonstração de Rocha e Silva (1951) da possibilidade de dessensibilização da musculatura lisa provocada por adições sucessivas, a curtos intervalos, de venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Denisonia* e *Naja* os quais apresentariam inúmeras atividades farmacológicas comuns;

* Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan. Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P. z
** Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.
*** Ex-Assistente do Setor de Soros Antipeçonhentos do Instituto Butantan. Professor Assistente Doutor do Departamoento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

Endereço para correspondência:
C.P. 65, São Paulo, Brasil.



Cheymol et al (1966) e Cheymol (1969), trabalhando com crotamina e com venenos crotálicos — crotamino-positivo e não crotamínico — constataram que a crotamina dessensibilizava, "in situ", a musculatura estriada, enervada ou nevrectomisada, e a musculatura lisa de órgãos isolados de ratos, à posterior aplicação do veneno de *C. d. terrificus* crotamino-positivo, e vice-versa; Rosenfeld et al (1970) demonstraram que nos acidentes muito graves provocados por envenenamentos crotálicos, ocorre, dentre outras manifestações, incoagulabilidade sangüínea.

Em seguida a determinação da DL50, propuzémo-nos a estudar os efeitos sobre os valores obtidos de uma pequena dose prévia, usando o mesmo veneno e um veneno botrópico de alto poder coagulante, tomando por base os índices coagulantes encontrados por Rosenfeld et al (1959).

MATERIAL E MÉTODOS

Venenos

Foram utilizadas amostras de venenos cristalizados a vácuo e mantidos a 0-4°C, obtidos de extrações recentes efetuadas pela Secção de Venenos do Instituto Butantan, em dezenas de exemplares de *C. d. terrifieus* (Laurenti, 1768) e de *Bothrops moojeni* Hoge, 1965* procedentes do interior do Estado de São Paulo e dos Estados visinhos.

Soluções de veneno

A solução do veneno botrópico era preparada em solução de NaCl a 0,85%, contendo 400 μg/ml, enquanto que a crotálica, conforme técnica preconizada por Vital Brazil (1911), era preparada em solução de NaCl a 1,5%, contendo 200 μg/ml. Tais soluções eram distribuidas em "flaconentes" os quais, uma vez hermeticamente fechados, eram conservados em congelador a -25°C (Furlanetto, R. S. 1965). No momento do uso, cada frasco era descongelado e as diluições necessárias eram providenciadas, desprezando-se as eventuais sobras. Partindo das soluções de veneno descritas e de conformidade com as doses pretendidas, eram feitas as diluições em solução de NaCl a 0,85%, em volumes sempre um pouco além do estritamente necessário. A dose de veneno inoculada em cada animal estava sempre contida em 0,5 ml.

As doses de veneno que deveriam ser aplicadas com o intuito de se obter resultados com os quais fosse possvel determinar-se a DL50 do veneno crotálico, eram norteadas por uma prova preliminar efetuada mediante a inoculação de quantidades variáveis do mesmo, segundo uma razão constante igual a 2. Uma vez conhecidas as doses limites, isto é, a maior dose que não causava a morte de nenhum dos animais e a menor dose que matava todos, eram calculadas as doses intermediárias, sempre através do emprego da seguinte fórmula: $R = \sqrt[1-n]{x}$, em que *n* representa o número de doses e *x* a razão entre as doses final e inicial.

* Classificada até 1965 como *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758).



Dose Preparatória ou simplesmente D.P.

Segundo Furlanetto, loc. cit., D.P. é uma dose de veneno botrópico que, contida em 0,5 ml e aplicada em camundongos de 18 a 22g, por via intravenosa, provoca uma incoagulabilidade sangüínea que atinge o máximo efeito uma a duas horas após sua administração. Para o caso da D.P. do veneno de *B. moojeni*, essa dose corresponde a 2 µg de u'a amostra cuja D.M.C. (dose mínima coagulante) seja igual a 0,4 µg.

Por D.M.C. ou U.C. (unidade coagulante), acima referida em relação ao veneno botrópico, entende-se uma unidade arbitrária por nós utilizada como referência de atividade coagulante, quer de venenos, quer de produtos coagulantes deles derivados. O esquema técnico foi tomado de Houssay et al (1918); essa unidade pode ser assim conceituada: chamamos D.M.C. ou U.C., a quantidade de produto coagulante ou de veneno, dissolvido depois de seco que, no volume de 0,2 ml é capaz de promover a coagulação, entre 8 a 10 minutos e a 37°C, de 1,0 ml de plasma normal de cavalo, adicionado de 2‰ de oxalato de potássio (o plasma deve ser colhido no dia do ensaio). O teste para essa determinação deve ser conduzido em tubos de ensaio de 14 mm X 14 cm, imersos em banho-maria a 37°C e considera-se coagulado o plasma quando se forma um bloco de fibrina capaz de escorregar pela parede do tubo, quando este é inclinado.

Animais utilizados

Todos os ensaios foram realizados em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758 — sem distinção de sexo, pesando de 18 a 22 g, fornecidos pelo Biotério Geral do Instituto Butantan.

Via de inoculação

A via intravenosa foi utilizada em todas as provas.

Tempo de observação: 1/2, 1, 2, 24 e 48 horas.

Convenção adotada

Todos os ensaios expressam resultados através de uma relação numérica onde sempre o numerador representa o número de animais mortos e o denominador o total de animais inoculados em cada dose.

Cálculo da DL50

Todos os ensaios apresentam DL50 que foram calculadas com os resultados apresentados após 24 e 48 horas, das inoculações, pelo método de Reed & Müench (1938).

Prova para a Detecção da Crotamina

Foi empregada a técnica adotada por Schenberg (1959) que consiste em inocular, por via sub-cutânea, 0,5 mg de veneno crotálico contido em 1,0 ml

de solução de NaCl a 0,85% em cada um de dois camundongos de peso entre 23 a 25 g. A presença de crotamina será denunciada pelo aparecimento, nos dois animais, de uma paralisia dos membros posteriores, dentro do prazo de 30 minutos.

RESULTADOS

TABELA I

Determinação da DL50 do veneno de C. d. terrificus, *crotamino-positivo, de coloração branca. Cada dose estava contida em 0,5 ml e era inoculada, por via intravenosa, em camundongos de 18 a 22 g.*

Tempo de observação	Doses em microgramas							DL50
	2,00	2,40	2,88	3,46	4,15	5,00	6,00	
1/2 hora	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
1 hora	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
2 horas	0/6	0/6	0/6	1/6	1/6	3/6	3/6	
24 horas	0/6	2/6	4/6	5/6	6/6	6/6	6/6	2,70 μg
48 horas	0/6	2/6	4/6	5/6	—	—	—	2,70 μg

Como se pode verificar, a determinação da DL50 do veneno de *C. d. terrificus* pode ser conseguida mediante a aplicação direta do mesmo, em camundongos, isto é, prescindindo de qualquer tratamento prévio, visto não ocorrerem mortes imediatas e, principalmente, não haver incoerências entre a progressão das doses e o número de mortes, como sóe acontecer com venenos botrópicos. Não obstante, decidimos estudar a influência que uma dose preliminar, infra-letal, do próprio veneno exerceria sobre a DL50, à semelhança da D.P. anteriormente feita com venenos botrópicos (Furlanetto et al, 1973a e 1973b).

Provas preliminares demonstraram que 1.0 μg do mesmo veneno utilizado na Tabela I, era a dose máxima tolerada pelos animais utilizados, sem manifestações aparentes de intoxicação.

TABELA II

Determinação da DL50 do veneno de c. d. terrificus, crotamino-positivo, de coloração branca, em camundongos de 18 a 22 g, tratados, duas horas antes com 1,0 μg do próprio veneno. Foi usado o mesmo veneno do ensaio anterior. Cada dose estava sempre contida em 05 ml e era inoculada por via intravenosa.

Tempo de observação	Doses em microgramas							DL50
	2,00	2,40	2,88	3,46	4,15	5,00	6,00	
1/2 hora	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	
1 hora	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	2/6	3/6	
2 horas	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6	5/6	6/6	
24 horas	4/6	4/6	5/6	5/6	6/6	6/6	6/6	2,15 μg
48 horas	4/6	4/6	6/6	6/6	—	—	—	2,00 μg

Comparando-se a DL50 da Tabela I (2, 70 μg) com a Tabela II, nota-se que houve um nítido agravamento do quadro tóxico, pois o valor da DL50 baixou a 2,0 μg em 48 horas de observação. Não houve, pois, a dessensibilização induzida pela dose prévia de veneno e sim, ao contrário, poderíamos pensar numa somatória de efeitos.

Face aos resultados obtidos, decidimos verificar se a incoagulabilidade sangüínea conseguida por D.P. de um veneno botrópico altamente coagulante, alteraria a DL50 do veneno crotálico, visto Rosenfeld et al (1970) referirem que nos acidentes muito graves provocados por envenenamentos crotálicos ocorre, dentre outras manifestações, incoagulabilidade sangüínea. Ademais, Furlanetto et al (1973b) demonstraram haver proteção cruzada entre os venenos dos crotalideos do gênero *Bothrops*.

TABELA III

Determinação da DL50 do veneno de C. d. terrificus, *crotamino-positivo, de coloração branca, em camundongos de 18 a 22 g, tratados, duas horas antes, com 2 μg de veneno de* B. moojeni. *Cada dose estava sempre contida em 0,5 ml e era inoculada por via intravenosa.*

Tempo de observação	Doses em microgramas							DL50
	2,00	2,40	2,88	3,46	4,15	5,00	6,00	
1/2 hora	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
1 hora	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
2 horas	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	2/6	
24 horas	1/6	2/6	4/6	5/6	6/6	6/6	6/6	2,64 μg
48 horas	1/6	2/6	4/6	5/6	—	—	—	2,64 μg

Os resultados da Tabela III, confrontados com os da Tabela I, levam-nos a acreditar que a D.P. do veneno de *B. moojeni* não interfere, em qualquer sentido, na determinação da DL50 do veneno de *C.d.terrificus.*

DISCUSSÃO

A análise dos dados contidos na Tabela I, demonstra a possibilidade do cálculo da DL50 de venenos crotálicos, crotamino-positivos, através do emprego de camundongos, visto que, a inoculação por via intravenosa de doses escalonadas do veneno, apresenta resultados que guardam íntima relação entre a progressão das mesmas e seus efeitos.

Tais resultados foram por nós repetidamente confirmados, embora deixemos de apresentar os respectivos protocolos, por acreditarmos serem os mesmos dispensáveis.

A inoculação prévia de 1,0 μg do próprio veneno crotálico, por via intravenosa (Tabela II), surpreendentemente não exerceu qualquer dessensibi-

lização às doses maiores, conforme poderia ser esperado diante dos resultados encontrados por Rocha e Silva (1951) que, trabalhando "in vitro", mostrou a possibilidade de dessensibilização da musculatura lisa provocada pelo próprio veneno. Contraria, também, o que poderia ser esperado pelos resultados de Cheymol et al (1966) e Cheymol (1969) que, trabalhando "in situ" constataram que a crotamina dessensibilizava a musculatura estriada, enervada ou nevrectomisada, do rato.

Os nossos resultados mostram que não houve dessensibilização "in vivo", pela inoculação prévia de dose infra-letal do mesmo veneno, mas, ao contrário, parece haver, realmente, um efeito somatório entre a dose prévia de 1,0 μg e as doses necessárias para a determinação da DL50 do veneno crotálico, crotamino-positivo, por nós utilizado.

Por outro lado, a injeção de doses infra-letais (D.P.) de veneno de *B. moojeni* que, segundo Furlanetto et al (1973a e 1973b) leva a uma proteção cruzada marcante à inoculação de doses elevadas de venenos das serpentes do mesmo gênero, não interfere, em qualquer sentido, no valor da DL50 do veneno crotálico, apezar da incoagulabilidade sangüínea provocada pela citada D. P.

CONCLUSÕES

1. A DL50 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768), de coloração branca, crotamino-positivo, pode ser determinada através de inoculações, por via intravenosa, em camundongos *Mus musculus* Linnaeus, 1758 — de 18 a 22 g, sem distinção de sexo.

2. A inoculação de 1,0 μg de veneno crotálico, crotamino-positivo, em camundongos, por via intravenosa, duas horas antes das doses escalonadas do mesmo veneno, suficientes para a determinação de sua DL50, induz a uma baixa do valor desta. Trata-se, ao que parece, de uma somatória de efeitos entre a dose prévia e as doses finais.

3. Camundongos tratados com "dose preparatória" (D.P.), do veneno de *Bothrops moojeni* Hoje, 1965, não apresentam sensibilidade maior ou menor ao veneno de *C. d. terrificus*, de coloração branca, crotamino-positivo, inoculados com doses escalonadas suficientes para propiciar o cálculo de sua DL50.

SUMMARY — The utilization of mice — *Mus musculus* — permits the calculation of the LD50 of *Crotalus durissus terrificus* venom (with crotamin) by intravenous route.

The inoculation of sublethal doses, two hours before, does not desensitize the animal, as demonstrated by the LD50 value.

The previous inoculation of a highly coagulant venom (*Bothrops moojeni*) in such doses that are enough to impede the blood coagulation (2,0 μg), does not interfere with the LD50 value of *Crotalus durissus terrificus*.

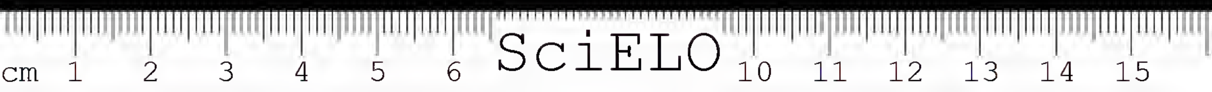
UNITERMS — *Crotalus* venom; LD50 of *Crotalus* venom.

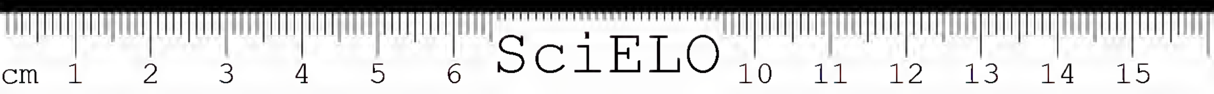
ROLIM ROSA, R., FURLANETTO, S. M. P., SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) em *Mus musculus* Linnaeus, 1758.
Mem. Inst. Butantan, 37: 131-137, 1973.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRAZIL, V. — *A defesa contra o ophidismo*. São Paulo, Pocai Weiss, 1911.
2. CHEYMOL, J.; BOURILLET, F. & ROCH ARVEILLER, M. — Action neuro-musculaire des venins de quelques *Crotalidae, Elapidae* et *Hydrophiidae*. *Mem. Inst. Butantan*, 33: 541-554, 1966. .
3. CHEYMOL, J. — Neuromuscular effets of venoms from 2 varieties of *Crotalus durissus terrificus*. *Arch. int. Pharmacodyn*, Gand, 179: 40-55, 1969.
4. FURLANETTO, R. S. — *Emprêgo de camundongos com doses preparatórias reparatórias de venenos bothropicos para avaliação de DL50 desses venenos*. São Paulo, 1965. /Tese — Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo/
5. FURLANETTO, R. S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos *Mus musculus* Linnaeus, 1758. II. Possibilidade de determinação da DL50 através da inoculação prévia de doses infra-letais do próprio veneno. *Mem. Ins. Butantan*, 1973a (no prelo).
6. FURLANETTO, R. S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & NAVAS, J. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos *Mus musculas* Linnaeus, 1758. III. Possibilidade de determinação da DL50 através da proteção cruzada conferida por doses infra-letais de outros venenos de serpentes do mesmo gênero. *Mcm. Inst. Butantan*, 1973b (no predlo)
7. HOGE, A. R — Preliminary account on neotropical *Crotalinae* (Serpentes *Viperidae*). *Mem. Inst. Butantan*, São Paulo, 32: 109-184.1965.
8. HOUSSAY, B. A.; SORDELLI, A. & NEGRETE, J. — Estudios sobre los venenos de serpientes. V. Influencia de los venenos de serpientes sobre la coagulation de la sangre. II. Ación de los venenos coagulantes.*Rev. Inst. bac.*, Buenos Aires, 1 (5): 565-616, 1917/18.
9. ROCHA E SILVA, M. — *Bradicinina, preparação, ensaio biológico, identificação*. Rio de Janeiro, 19511. /Tese — Faculdade Nacional de Medicina da Universidade do Brasil/.
10. REED, L. J. & MÜENCH, H. — A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, Baltimore, 27: 493-497, 1938.
11. ROSENFELD, G.; HAMPE, O. G. & KELEN, E. M. A. — Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms; determination of coagulant and fibrinolytic index of diferent species. *Mcm Inst. Butantan*, São Paulo, 29: 143-163, 1959.
12. ROSENFELD, G.; NAHAS, L.; DE CILLO, D. J. & FLEURY, C. T. — Envenenamento por serpentes, aranhas e escorpiões. In: PRADO, F. C. do; RAMOS, J. A. & RIBEIRO DO VALLE, J. — *Atualização terapêutica*. Rio de Janeiro, Luso-Espanhola e Brasileira, 1970, p. 984-992.
13. SCHENBERG, S. — Análise da crotamina no veneno individual de cascavéis recebidas pelo Instituto Butantan. *Mcm. Ins. Butantan*, São Paulo, 29: 213-226, 1959.

Recebido para publicação em 15.VI.73.
Aceito para publicação em 15.VIII.73.




cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
10 11 12 13 14 15

Mem. Inst. Butantan
37: 139-148, 1973

ESTUDOS SOBRE A FIXAÇÃO ELETIVA E QUANTITATIVA DO VENENO DE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* NOS TECIDOS NERVOSO, RENAL, HEPÁTICO E MUSCULAR DE *MUS-MUSCULUS* Linnaeus, 1758.

WALTER BANCHER *
RAYMUNDO ROLIM ROSA**
REYNALDO SCHWINDT FURLANETTO ***

RESUMO — Os autores demonstraram uma fixação quantitativa do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre diferentes tecidos de *Mus-musculus*, em termos de DL50 fixadas por grama de tecido. Fixações quantitativas sobre os tecidos nervoso, hepático, renal e muscular em ordem decrescente foram observadas mostrando que provavelmente este veneno exerça complexa ação nestas várias estruturas, durante o envenenamento experimental.

UNITERMOS — Fixação de veneno crotálico sobre tecidos animais. Veneno crotálico. Veneno de *Crotalus durissus terrificus.*

INTRODUÇÃO

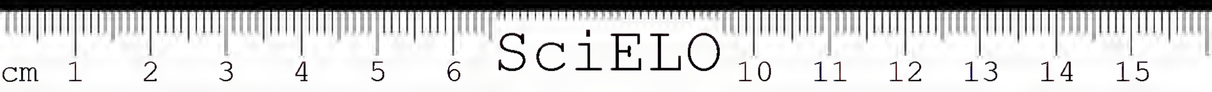
O veneno de *Crotalus durissus terrificus* tem sido descrito como possuidor de uma intensa ação hemolítica, neurotóxica e nefrotóxica. São numerosos os trabalhos demonstrando comprometimentos na indução do estímulo nervoso provocados pelo envenenamento experimental, Houssay et al (1922) Houssay & Hug (1928), Brazil (1954), Brazil et al (1966) Cheymol (1969 e 1971); comprometimentos renais também têm sido descritos no decurso do envenenamento crotálico tanto experimental como em acidentes humanos. Amorim e Mello (1954) Amorim et al (1951-1960 e 1969) Rodrigues Lima (1963), Hadler & Brazil (1966); alterações da pressão arterial, Vellard & Huidobro (1941) e Brazil (1954) entre outros. Entretanto não encontramos dados na literatura sobre a ação deste veneno no tecido hepático, bem como nada encontramos

* Professor Regente da disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas de Santos e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

*** Ex-chefe da Secção de Imunoterapia do Instituto Butantan e atual Professor Catedrático do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Endereço para correspondência:
C.P. 4365, S. Paulo, Brasil.



que pudesse demonstrar de forma quantitativa a ação eletiva deste veneno sobre os tecides nervoso, renal, hepático e muscular de camundongos. Tendo em vista que as lesões e ações até aqui descritas na literatura, nada informam de quantitativo sobre a fixação eletiva nos vários tecidos como parte de um complexo da intoxicação experimental pelo envenenamento crotálico, decidimos, baseado nos moldes do trabalho clássico de Wassermann & Takaki (1898) determinar em vários tecidos isolados qual a quantidade absoluta de veneno fixado. Relações de fixações qualitativas entre a toxina botulínica e o tecido cerebral foi demonstrada por Kempner & Schepilewski (1898) enqúanto que Myers (1899) demonstrava uma relação entre o veneno de Cobra e o tecido supra-renal. Nos nossos trabalhos resolvemos estudar se realmente também o veneno de *Crotalus durissus terrificus* se fixava de forma diferente nos vários tecidos estudados; em se confirmando a nossa suspeita, outros trabalhos seguiriam procurando demonstrar por técnicas anátomopatológicas, associada às técnicas de imunofluorescência, quais os diferentes sítios de fixação deste veneno nos diferentes tecidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Doze camundongos pesando entre 18 e 22 gramas eram mortos com éter sulfúrico e imediatamente após eram removidos o encéfalo, o rim, o fígado e os músculos esqueléticos da região das patas posteriores; cada tecido coletado era colocado em placa de Petri estéril e a seguir rigorosamente pesado. Uma quantidade próxima de 5,0 gramas de cada tecido era em seguida triturada até ficar reduzida a um estado pastoso. Após esse processo era adicionado ao triturado obtido, uma quantidade variável de veneno crotálico, crotamina positivo, equivalente a um determinado número de DL50 conforme a experiência em causa. A DL 50 do veneno de *Crotalus durissus terrificus** era calculada pelo método de Reed Muench (1938) de acordo com Rolim Rosa et al (1973). No presente trabalho a DL50 do veneno era de 3,64 μg.

O veneno era cuidadosamente misturado com o triturado de tecido e levado à estufa a 37°C por 60 minutos com homogeinização do preparado a cada 10 minutos. A seguir o material era centrifugado a 10.000 rpm durante 2 horas a 4°C para a separação do sobrenadante. Este era convenientemente diluído a fim de se determinar o número de DL50 de veneno crotálico livre, isto é, não fixadas ao tecido.

Experiências-piloto mostraram-nos que trabalhando-se com tecido nervoso em velocidades inferiores de centrifugação, não ocorria o depósito total das

* Hoge (1965) (1971) demonstra que as cascavéis encontradas no Brasil pertencem às seguintes subespécies: *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti — 1768) — *C. d. collilineatus* (Amaral — 1926) — *C. d. cascavella* (Wagler — 1824) — *C. d. marajoensis* (Hoge — 1965) e *C. d. ruruima* (Hoge — 1965).
Segundo estas observações inferimos que, na realidade, os trabalhos nos quais consta o nome *Crotalus terrificus terrificus* deveriam referir-se a outras subespécies ou mais provavelmente, à mistura dos venenos de *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus* (Belluomini, 1972).

células do tecido, e, assim sendo a inoculação do sobrenadante puro sem diluir, por via venosa acarretava sempre a morte imediata do animal, seguramente não pela ação do veneno, comprovada pela ausência total de sintomas de envenenamento crotálico. Tendo-se em vista o pouco volume com que trabalhávamos e a impossibilidade de filtração em membranas Millipore, resolvemos, no caso de se utilizar tecido nervoso, inocular o sobrenadante puro por via intraperitoneal. Nos demais casos, a inoculação era sempre feita por via venosa.

RESULTADOS

Ensaios relativos a fixação quantitativa do veneno sobre o tecido encefálico.

TABELA I

Ao tecido encefálico recém obtido de camundongos de 18 a 22 g foram adicionadas 20 DL50 de veneno por grama de tecido e a seguir o preparado foi incubado por 60 minutos a 37°C. Centrifugado a 10.000 rpm, o sobrenadante obtido foi convenientemente diluido, tentando-se detectar a quantidade de veneno livre inoculando-se em camundongos.

dil. sb.	v. inc	DL50 presun.	Observações		
			12h	24h	48h
1:1	IP	5,0	0/6	0/6	0/6
1:2 5	V	2,0	0/6	0/6	0/6
1:5	V	1,0	0/6	0/6	0/6
1:10	V	0,5	0/6	0/6	0/6

Observações: dil. sb. = diluição do sobrenadante feita em solução de NaCl 0,85%.

v. inc. = via de inoculação: IP = intraperitoneal.

V = via venosa.

DL50 presum. = doses letais 50% presumivelmente presentes no sobrenadante inoculado, se não houvesse fixação do veneno pelo tecido. O numerador indica o número de animais mortos e o denominador o número de animais inoculados. O volume inoculado foi sempre de 0,5 ml.

Estas observações são válidas para as demais tabelas.

Visto ter havido absorção total de 20 DL50 por grama de tecido, decidimos trabalhar nas mesmas condições descritas na Tabela I, com quantidades maiores de veneno por grama de tecido encefálico recém obtido. As tabelas de números II, III e IV mostram os resultados obtidos.

TABELA II

Ao tecido encefálico triturado foram adicionadas 75 DL50 de veneno por grama de tecido, tudo no mais conforme a Tabela I.

dil. sb.	v. inc.	DL50 presum.	Observações		
			12h	24h	48h
1:1	IP	12,5	0/6	0/6	0/6
1:1,25	IP	10,0	0/6	0/6	0/6
1:2,5	V	5,0	0/6	0/6	0/6
1:5	V	2,5	0/6	0/6	0/6

TABELA III

Ao tecido encefálico recém obtido e triturado foram adicionadas 270 DL50 de veneno por grama de tecido, tudo no mais conforme a Tabela I.

dil. sb.	v. inc.	DL50 presum.	Observações		
			12h	24h	48h
1:1	IP	45,0	3/6	6/6	—
1:2	V	22,5	0/6	0/6	0/6
1:3	V	15,0	0/6	0/6	0/6
1:4	V	11,25	0/6	0/6	0/6

TABELA IV

Ao tecido encefálico recém obtido foram adicionadas 360 DL50 de veneno por grama de tecido, tudo no mais conforme a Tabela I.

dil. sb.	v. inc.	DL50 presum.	Observações		
			12h	24h	48h
1:1	IP	60,0	4/6	6/6	—
1:1,25	IP	48,0	3/6	6/6	—
1:2,5	V	24,0	0/6	2/6	2/6
1:5	V	12,0	0/6	0/6	0/6

Pelos resultados expostos nas Tabelas I, II, III e IV pode-se verificar que nas nossas condições experimentais o encéfalo do camundongo é capaz de fixar cerca de 24 DL50 de veneno de *Crotalus durissus terrificus* por grama de tecido.

Ensaios sobre a fixação quantitativa do veneno sobre o tecido renal.

Conforme visto nos ensaios realizados com o encéfalo, foram também necessárias várias tentativas com números variáveis de DL50 adicionadas a

cada grama de tecido renal a fim de se poder avaliar a sua capacidade de fixação do veneno. Acreditando que seria fastidioso repetir todos os protocolos preliminares, somente apresentaremos aqui a Tabela que nos forneceu o resultado desejado, isto é, aquela que permitiu a avaliação procurada.

TABELA V

A 50 g de tecido renal recém obtidos de camundongos de 18 a 22 g foram adicionadas 360 DL50 de veneno por grama de tecido e tudo no mais conforme a Tabela I.

dil. sb.	v. inc.	DL50 presum.	Observações		
			12h	24h	48h
1:2,5	V	24,0	4/6	6/6	—
1:5	V	12,0	4/6	5/6	5/6
1:10	V	6,0	0/6	3/6	3/6
1:20	V	3,0	0/6	1/6	1/6
1:30	V	2,0	0/6	0/6	0/6

Pelos resultados expostos na Tabela V pode-se verificar que nas nossas condições experimentais o rim do camundongo é capaz de fixar cerca de 6 DL50 de veneno de *Crotalus durissus terrificus*, por grama de tecido.

Ensaios sobre a fixação quantitativa do veneno sobre o tecido muscular.

Pelas mesmas razões expostas no ensaio anterior, apresentamos aqui somente a tabela experimental que permitiu avaliar a fixação do veneno pelo tecido muscular.

TABELA VI

A 5,0 g de tecido muscular recém obtido de camundongos de 18 a 22 g foram adicionadas 360 DL50 de veneno por grama de tecido e tudo no mais conforme a Tabela I.

dil. sb.	v. inc.	DL50 presum.	Observações		
			12h	24h	48h
1:2,5	V	24,0	6/6	—	—
1:5	V	12,0	6/6	—	—
1:10	V	6,0	5/6	6/6	—
1,20	V	3,0	4/6	5/6	5/6
1:30	V	2,0	0/6	3/6	3/6

Pelos resultados expostos na Tabela VI pode-se verificar que, nas nossas condições experimentais, o tecido muscular de camundongo é capaz de fixar ao redor de 2 DL50 de veneno de *Crotalus durissus terrificus*, por grama de tecido.

Ensaios sobre a fixação quantitativa do veneno sobre o tecido hepático.

Pelas mesmas razões expostas no ensaio sobre a fixação quantitativa do veneno sobre o tecido renal apresentamos aqui somente a tabela experimental que permitiu avaliar a fixação do veneno pelo tecido hepático.

TABELA VII

A 5,0 g de tecido hepático recém obtido de camundongos de 18 a 22 g foram adicionadas 270 DL50 de veneno por grama de tecido e tudo no mais conforme a Tabela I.

dil. sb.	v. inc.	DL50 presum.	Observações 12h	24h	48h
1:1	V	45,0	6/6	—	—
1:2	V	22,5	5/6	6/6	—
1:3	V	15,0	1/6	4/6	4/6
1:4	V	11,25	0/6	0/6	0/6

Verifica-se aqui que nas nossas condições experimentais, o tecido hepático de camundongo é capaz de fixar ao redor de 15 DL50 de veneno de *Crotalus durissus terrificus*, por grama de tecido.

Entendemos ser conveniente apresentar a Tabela VIII reunindo os resultados dos vários ensaios relativos à fixação eletiva quantitativa do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre os diferentes tecidos por nós experimentados.

TABELA VIII

Comparação entre a fixação quantitativa do veneno sobre os tecidos nervoso, renal, hepático e muscular de camundongos.

Tecido	Número de DL50 fixadas aproximadamente por grama de tecido
nervoso	24
renal	6
hepático	15
muscular	2

DISCUSSÃO

Parece ser esta a primeira vez que se demonstra quantitativamente haver fixação do veneno crotálico em vários tecidos do camundongo. Em toda a literatura consultada são descritas lesões anatomopatológicas sobretudo no tecido renal; não conhecemos ainda descrições anatomopatológicas de lesões do tecido nervoso que evidentemente devem existir face a sintomatologia do en-

venenamento (Rosenfeld 1969 e 1971) e face a observação da Tabela VIII. Esta tabela mostra uma maior afinidade do veneno para o tecido nervoso do que pelo tecido renal; tal resultado não se contrapõe aos trabalhos de Amorim & Mello (1954) e Amorim et al. (1951-1960 e 1969) visto que estes autores encontraram em casos humanos e experimentais, lesões renais, atribuindo a ocorrência da morte como uma conseqüência de síndrome do nefron intermediário. Face aos nossos resultados, podemos nesta altura dos nossos conhecimentos, pressupor que as lesões do encéfalo devam contribuir também de modo preponderante no evento mortal.

Segundo Cheymol et al. (1969), a ação do veneno contendo crotamina sobre a fibra muscular, produzindo sua contração, seria devida a uma despolarização direta. Este efeito é taquifilático. O veneno sem crotamina produ-
durissus terrificus, por via venosa, em camundongos (*Mus-musculus*) de 18
ziria um bloqueio neuromuscular induzindo lentamente a uma ação irreversível. Este efeito seria devido principalmente à ação direta a fibra muscular e também, quando são usadas grandes doses de veneno, a um bloqueio dos receptores específicos da membrana post-sináptica.

Cheymol et al. (1971), trabalhando com camundongos, galinhas e ratos, verificaram que o veneno "in natura" é mais tóxico que a crotamina produzindo contrações típicas e uma paralisia no camundongo e, somente paralisia em galinhas. A crotamina induz a contrações no camundongo mas não produz efeitos em galinhas. Em preparações neuro musculares em galinhas "in situ" o veneno "in natura" leva lentamente a uma paralisia irreversível. A crotamina, nas mesmas condições, não leva nem à paralisia nem à contração. Nos ratos, em preparações neuromusculares "in situ", o veneno "in natura" e a crotamina mostraram efeitos semelhantes. Contrações eram conseguidas com altas doses, geralmente seguidas por uma paralisia reversível da fibra muscular. No rato, a ação da crotamina situar-se-ia ao nível da membrana da fibra muscular. Uma mudança na permeabilidade dos íons Ca ou Na provocariam contrações. Estas contrações induziriam a um efluxo do íon K responsável pela segunda fase da ação crotamínica.

Nossos resultados obtidos com tecido muscular não nos permitem afirmar, pela pequena fixação eletiva encontrada nesse tecido, se tal fixação se deve realmente ao tecido muscular ou a sua inervação, que não foi por nós removida.

Não encontramos dados na literatura sobre a ação do veneno crotálico no tecido hepático. Os resultados das Tabelas VII e VIII nos permite supor que deva haver grande comprometimento hepático no envenenamento crotálico, talvez até mesmo maior do que aqueles observados no parênquima renal.

Trabalho de Bancher (1972) mostra ser possível, detectar por técnicas de imunofluorescência zonas de fixação eletiva do veneno crotálico no encéfalo e no parênquima renal.

Resultados ainda não publicados e obtidos por Bancher, Rolim Rosa e Furlanetto (1972), após inoculações de doses elevadas de veneno de *Crotalus* a 22 g, que provocam a morte do animal em menos de quatro horas, com sintomatologia do envenenamento, revelaram, através de técnicas de imunofluo-

rescência, zonas de fixação do veneno em diferentes áreas do encéfalo e ausência de zonas de fluorescência no parênquima renal. Este fato experimental sugere a hipótese de que o veneno, na dependência da dose inoculada, exerça uma ação neurotóxica muito intensa e que, por si só, seria capaz de levar o animal à morte, independentemente de qualquer lesão renal.

Atualmente prosseguimos na mesma linha de pesquisa procurando evidenciar pelas técnicas anátomopatológicas e de imunofluorescência quais os diferentes sítios de fixação do veneno nos vários tecidos aqui estudados.

CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos nas condições de nosso trabalho, acreditamos ser lícito concluir que:

1. O tecido nervoso do camundongo (*Mus-musculus*) tem elevada capacidade de fixar o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, crotamino positivo, ao redor de 24 DL50 por grama de tecido.

2. A fixação daquele veneno pelo tecido renal é em termos de DL 50 cerca de quatro vezes menor daquela apresentada pelo tecido nervoso.

3.. O tecido hepático revelou-se capaz de fixar mais veneno do que o tecido renal, isto é, cerca de 15 DL50 por grama de tecido.

4. Parece que o tecido muscular pode fixar relativamente pequenas quantidades de veneno.

SUMMARY — The authors showed a quantitative fixation of *Crotalus durissus terrificus* venom on different tissues of *Mus-musculus* by establishing the quantity of LD50 fixed by each gram of tissue.

Quantitative fixations were observed on nervous, hepatic, renal, and muscular tissues in decreasing order showing a probable complex action of this venom on these various structures during the experimental poisoning.

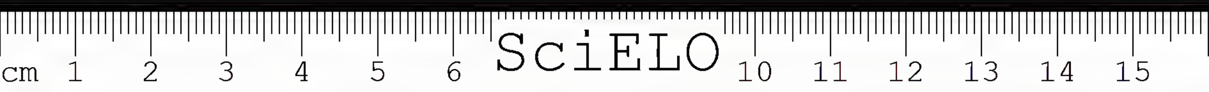
UNITERMS — Fixation of *Crotalus* venom on animals' tissues. *Crotalus* venonm. *Crotalus durissus terrificus* venom.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMORIM, M. F. & MELLO, R. F. — Intermediate nephoron-nephrosis from snake poisoning in man *Amer. J. Path.*, 30: 479-499, 1954.

2. AMORIM, M. F.; MELLO R. F. & SALIBA, F. — Envenenamento botrópico e crotálico. Contribuição para o estudo experimental comparado das lesões. *Mem. Inst. Butantan*, 23: 63-108, 1951.

3. AMORIM, M. F.; MELLO, R. F. & SALIBA, F. — Intermediate nephron-nephrosis experimentally induced with Crotalus t. terrificus venom in the dog. *Rev. bras. Biol.*, 20: 359-364, 1960.



4. AMORIM, M. F.; MELLO, R. F. & SALIBA, F. — Lesões renais induzidas experimentalmente no cão pelo veneno crotálico. *Mem. Inst. Butantan*, 34: 137-157, 1969.

5. BANCHER, W. — *"Estudos sobre a fixação eletiva do veneno de* Crotalus durissus terrificus *sobre os tecidos nervoso, renal e muscular, em camundongos* (Mus-musculus) *e aplicação da imunofluorescência como método revelador dos sítios de fixação desse veneno".* São Paulo, 1972. 54 p. /Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/

6. BELLUOMINI, H. E. — Comunicação pessoal — 1972.

7. BRAZIL, O. V. — Hiperpiese provocada pela peçonha da *Crotalus t. terrificus*. *An. Fac. Med. S. Paulo*, 28: 159-174, 1954.

8. BRAZIL, O. V.; FARINA, YOSHIDA, L. & OLIVEIRA, A. V. — Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Cardiovascular and respiratory effects of crotoxin and Crotalus durissus terrificus venom. *Mem. Inst. Butantan*, 33: 993-1000, 1966.

9. CHEYMOL, J.; BOURILLET, F.; ROCH ARVEILLER, M. & TOAN, I. — Effets neuromusculaires des venins de deux varietés de Crotalus durissus terrificus. *Arch. Int. Pharmacodyn. et Therapie*, 179: 40-55, 1969.

10. CHEYMOL, J.; GONÇALVES, J. M.; BOURILLET, F. & ROCH ARVEILLER, M. — Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de Crotalus durissus terrificus var. crotaminicus. I. Sur préparation neuromusculaires "in situ". *Toxicon*, 9: 279-286, 1971.

11. HADLER, W. A. & BRAZIL, O. V. — Pharmacology of crystalline crotoxin. IV. Nephrotoxicity. *Mem. Inst. Butantan*, 33: 1001-1008, 1966.

12. HOGE, A. R. — Preliminary account on neotropical Crotalinae (serpents Viperidae). *Mem. Inst. Butantan*, 32: 109-184, 1965.

13. HOGE, A. R. & ROMANO, S. A. R. W. D. L. — Neotropical pit vipers, sea snakes and coral snakes. In BUCHERL, W. & BUCKLEY, E., ed. *Venomous animals and their venoms*. New York, Academic Press, 1971, v 2, p. 211-293.

14. HOUSSAY, B. A. & HUG, E. — Accion de l'apomorphine et du venin de Crotale sur les centres respiratoires et vagaux de la tête isolée. *C. R. Soc. Biol.*, 99: 1509-1511, 1928.

15. HOUSSAY, B. A.; NEGRETTE, M. & MAZZOCCO, P. — Acción de los venenos de serpientes sobre el nervio y músculo aislado. *Rev. Asoc. méd. argent.*, 35: 699-714, 1922.

16. KEMPNER, W. & SCHEPILEWSKY, E. apud ZINSSER, H. & BAYNE JONES — *Tratado de bacteriologia*. Rio de Janeiro, Imp. Nacional, 1947, p. 194.

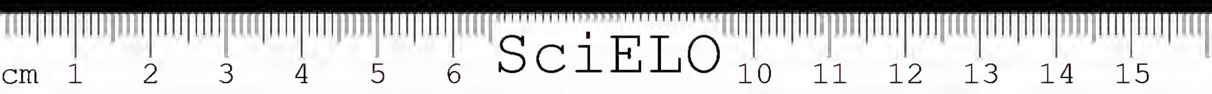
17. MYERS apud ZINSSER, H. & BAYNE JONES — *Tratado de bacteriologia*. Rio de Janeiro, Imp. Nacional, 1947, p. 194.

18. REED, L. J. & MUENCH, H. — A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27: 493-497, 1938.

19. RODRIGUES LIMA, J. P. — *Necrose tubular aguda por mordedura de animais peçonhentos*. Campinas, 1966, p. 22-38. /Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de Campinas/

20. ROLIM ROSA, R.; FURLANETTO, S. M. P.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti 1768), em Mus-musculus (Linnaeus, 1758). *Mem. Ins. Butantan*, 1973. [no prelo]

21. ROSENFELD, G. — Ação neurotóxica de venenos ofídicos (crotalus e micrurus) no sistema nervoso central. Interpretação clínica. *Ciência e Cultura*, 23: 359, 1971.



BANCHER, W., ROLIM ROSA, R., FURLANETTO, R. S. — Estudos sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno de *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervoso, renal, hepático e muscular de *Mus musculus* Linnaeus, 1758.
Mem. Inst. Butantan, *37*: 139-148, 1973.

---

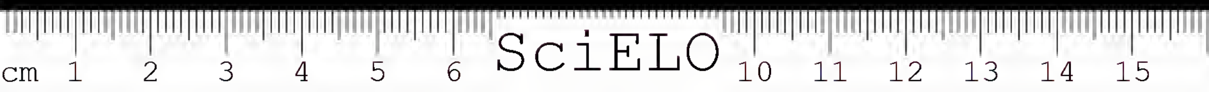
22. ROSENFELD, G. — Acidente por animais peçonhentos. In: VERONESI, R., ed. *Doenças infecciosas e parasitárias.* 4a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1969, p. 979-992.

23. VELLARD, J. & HUIDOBRO, F. — Acción comparada de diversos venenos ofídicos sobre la pressión arterial. *Rev. Soc. argent. Biol.,* **17**: 72-80, 1941.

24. WASSERMANN, A. & TAKAKI, T. apud ZINSSER, H. & BAYNE JONES — *Tratado de bacteriologia.* Rio de Janeiro, Imp. Nacional, 1947, p. 194.

Recebido para publicação em 18.VI.73.

Aceito para publicação em 15.VIII.73.



Mem. Inst. Butantan
37: 149-232, 1973

LESÕES DA MEDULA ESPINHAL NO MEGACÓLON

RUY PIAZZA

Seção de Anatomia Patológica
Instituto Butantan

RESUMO — O A. estudou as medulas de 21 casos de megacólon, mediante cortes semi-seriados, e verificou lesões disgenéticas em 18 casos, lesões adquiridas degenerativas em 2 e lesões combinadas em um.

Nos dois casos com lesões adquiridas, foram encontradas atrofias dos núcleos motores simpáticos (lesões secundárias); em 15 dos 19 casos de lesões medulares disgenéticas (incluindo o de lesões combinadas) foram verificadas aplasia, hipoplasia ou displasia dos núcleos motores simpáticos (lesões primárias); nos demais casos, as alterações de desenvolvimento não permitiram a identificação desses mesmos núcleos.

O A. considera tais achados de importância no mecanismo patogênico do megacólon, uma vez que a ligação entre medula e intestino é estabelecida pelos dois neurônios motores simpáticos periféricos e pelo neurônio sensitivo simpático, também periférico.

Tecendo considerações de ordem anatômica, o A. conclui que o estudo da medula é insuficiente para se avaliar a participação de todos os centros e núcleos motores simpáticos nesse mecanismo, e considera imprescindível o estudo sistemático também do tronco cerebral, particularmente do bulbo, onde se localiza o núcleo cárdio-pneumo-entérico.

No decorrer do trabalho, tece críticas aos trabalhos de Koeberle e cols., que atribuem à doença de Chagas a etiologia das enteromegalias.

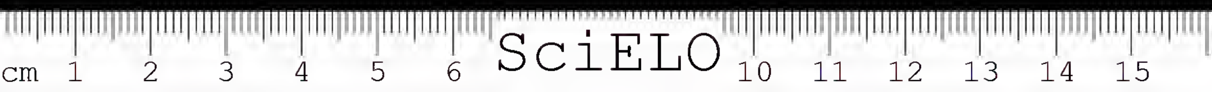
UNITERMOS — Megacólon; alterações de desenvolvimento medulares; disgenesias medulares; Sistema Nervoso Autônomo do setor abdominal.

INTRODUÇÃO

As enteromegalias — megaesôfago, megaestômago, megacólon e outras — constituem manifestações morfológicas de importante capítulo da patologia do aparelho digestivo, que se acompanham de não menos conspícuas manifestações funcionais, conhecidas por acalásia dos esfíncteres ou aperistalse.

Considerável número de pesquisadores estrangeiros e nacionais, desde quando surgiram as primeiras descrições da doença enteromegálica, ao que parece no século XVII, tentaram estabelecer sua causa e esclarecer seu mecanismo. Entre nós, Marcos Arruda, Bitençourt Rodrigues, Sergio Meira, Ignacio de Rezende, Pedro de Rezende, Carlos Chagas, Pereira Barreto, Enjolras Vampré, Arthur Neiva, Gaspar Vianna, Rafael Parisi, Eduardo Etzel, Almeida Prado, Moacyr Amorim, Alipio Correa Nette, Edmundo Vasconcelos e Pedreira de Freitas, foram alguns dos autores que estudaram e pesquisaram o assunto, desde 1895 até hoje.

Endereço para correspondência:
Av. Paulista, 2584 / apto. 102
01310 São Paulo, Brasil.



Das numerosas explicações patogênicas aventadas, que variaram desde as de natureza mecanicista até às que classificaram a doença entre as psicossomáticas, a hipótese do obstáculo funcional (acalásia do esfíncter) foi o que prevaleceu até que alguns trabalhos se fixaram no estudo dos plexos intramurais (sob influência do trabalho de HIRSCHSPRUNG[8] sobre o megacólon congênito), assinalando neles lesões degenerativas, diminuição do número de células ganglionares e, finalmente, lesões inflamatórias. As opiniões divergiram sobre a lesão inicial, se degenerativa ou inflamatória, e se a localização era exclusivamente esfincteriana (produzindo a acalásia) ou se se extendia a todo o plexo intramural (produzindo a aperistalse, nome proposto por BRASIL[3]).

Entre nós, até 1955, o trabalho de maior repercussão nesse campo foi o de AMORIM e CORREA NETTO[1], que concluíram que todo o plexo mioentérico de Auerbach estava afetado, apesar da enteromegalia ser apenas de localização esofageana e retal, no caso por eles estudado.

Mas, em 1955, vem à luz o trabalho de KOEBERLE e NADOR[9] em que encararam "o megaesôfago endêmico no Brasil como possuindo uma etiologia própria, dentro do conjunto geral do megaesôfago ou da dilatação esofágica idiopática", e concluíram que o megaesôfago brasileiro representa manifestação da doença de Chagas, idéia que fôra preliminarmente aventada por CHAGAS[5] em 1916 e por MINEIRO[20], em 1948, no 2.º Congresso Médico do Triângulo Mineiro e 1.º do Brasil Central (trabalho publicado 10 anos depois).

Inda que a espíritos mais lúcidos, como JAIRO RAMOS[22], esta hipótese não convenceu por inteiro, pois "se de um lado existem indicações que nos orientam para admitir que a doença de Chagas é responsável pelos síndromes cardíaco e digestivo, ou melhor, responsável pela miocardite e pelos distúrbios dos órgãos ôcos musculares que se caracterizam pelo prefixo mega; de outro lado há argumentos que contrariam este ponto de vista e que parecem indicar concomitância de duas doenças com etiologia diferente", de um modo geral a etiologia chagásica das enteromegalias prevaleceu na opinião de muitos, e numerosas foram as publicações nacionais e estrangeiras em seu apôio.

A obra de KOEBERLE[9, 10, 11, 12, 13], desenvolveu-se em duas frentes: 1. explicação patogênica; 2. comparação com o megaesôfago europeu.

1. *Explicação patogênica*

Para explicar a patogênese do megaesôfago, isto é, o mecanismo que desde a infecção chagásica leva à enteromegalia, criou um "novo conceito patogenético" sobre a moléstia de Chagas, pelo qual devemos distinguir duas entidades mórbidas bem distintas entre si:

1. Moléstia de Chagas propriamente dita.

2. Seqüelas ou "patias" chagásicas.

KOEBERLE[12] atribui as "patias" chagásicas à "destruição das células ganglionares do sistema nervoso central e/ou periférico" e diz que esse constitui "o elo perdido" na patogenia da moléstia de Chagas (referindo-se à conclusão



a que PRADO[21] chegara, no 1.º Congresso Internacional Sobre a Doença de Chagas, realizado em julho de 1959, no Rio de Janeiro, quando abordou os diversos mecanismos patogênicos da doença).

Apresenta como justificativa para incluir o S.N. Central na sua assertiva, apenas: a) uma frase de Gaspar Vianna em que este assevera que observou nele "em torno dos pseudocistos rotos (de leishmanias *) reação grande, na qual não raro perecem células nervosas"; b) uma afirmativa própria de que "esta neuroniólise é observada após a desintegração das leishmanias, o que indica libertação de uma substância neurotóxica ou neurolítica dos parasitas", que ilustra por uma figura de um corte de cerebelo *em pequeno aumento* em que aparecem, no seu dizer, "pseudo-cistos rotos, propagação das leishmanias para a camada das células de Purkinje. Notando-se na área de propagação das leishmanias, degeneração e desaparecimento das células ganglionares de Purkinje". Finaliza, porém, explicando que "Como existem apenas dois trabalhos quantitativos sobre a diminuição numérica dos neurônios do S. N. Central em camondongos e ratos deixaremos de entrar em pormenores sobre as neuropatias centrais do homem".

De modo que o próprio A. se incumbe de subtrair de sua explicação inicial (quando atribui as "patias" chagásicas à destruição das células ganglionares do S. N. Central e/ou Periférico) a parte referente ao S. N. Central.

Em outro artigo anterior[10], já houvera afirmado: "É inútil procurar lesões à distância, quando o comprometimento nervoso periférico local mostra desaparecimento".

Com efeito, todo o trabalho de KOEBERLE gira em torno da inervação vegetativa da parede do tubo digestório e é através desse estudo que estabelece o mecanismo patogênico das chamadas "enteromegalias chagásicas" que atribui à "denervação uniforme em toda a extensão do órgão que ultrapassa de 90%", baseado no estudo de 30 casos de megaesôfago "brasileiros" e em 15 "europeus"[12].

Sua conclusão sobre o mecanismo patogênico é que "essa redução (neuronal da parede) * constitui o substrato anatômico da aperistalsis do esôfago, que pode resultar em dilatação e hipertrofia do órgão".

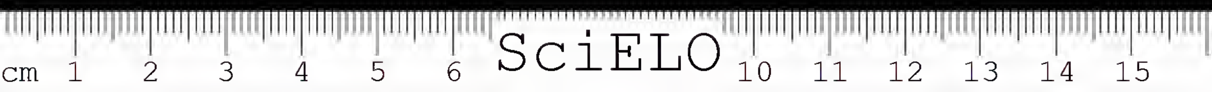
Essa "desnervação" seria uma "patia" chagásica, uma seqüela e não necessariamente uma forma de doença de Chagas ativa, aguda ou crônica. Apenas conseqüência das lesões neuronais produzidas na fase aguda pelas "toxinas" das leishmanias.

Da desnervação da parede, ao mega, os passos sucessivos seriam: a) hiperexcitabilidade vagal explicada pela desnervação (para o que invoca a lei de Cannon); b) aperistalse; c) dilatação do órgão por estase do bolo alimentar; d) hipertrofia secundária da musculatura por hiperdistensão da mesma.

2. *Comparação com o megaesôfago europeu*

A comparação com o megaesôfago europeu, que se impunha desde que, em colaboração com NADOR[9] publicara o primeiro trabalho sobre o megaesôfago "brasileiro", fez-se apenas no plano patogênico.

* O parêntese é meu.



No estudo dos 30 casos de megaesôfagos "brasileiros" e em 15 de europeus encontrou desnervação de igual magnitude (90%), conforme já referi, "em toda a extensão do órgão" e essa redução o leva a concluir que a mesma patogênese explica o megaesôfago brasileiro e o europeu, mas, se por um lado considera, naquele, a desnervação causada pela doença de Chagas, neste, a considera de causa desconhecida. A respeito, já escrevera anteriormente[10]: "Torna-se claro, portanto, que a doença de Chagas não é a única afecção que tem possibilidade de produzir um "mega". Qualquer outra doença que comprometa a periferia neurovegetativa, seja sistematizada ou localizada, pode levar à mesma conseqüência, isto é, produzir dilatação dos órgãos musculares ocos, através de lesões dos plexos intramurais".

Apesar desta judiciosa consideração de 1956, se generalizou entre nós a opinião que toda enteromegalia era de natureza chagásica e as expressões megaesôfago chagásico, megacólon chagásico etc. se tornaram lugares comuns da terminologia médica, para o que contribuiu o próprio autor, que no trabalho de 1963[12] acentua: "o megaesôfago endêmico constitui uma síndrome de etiologia e patogenia definida no Brasil".

Aos poucos, o conceito estendeu-se aos países vizinhos e não faltaram contribuições estrangeiras que vieram em seu apôio. Por exemplo, ATIAS, MACKAY, CAMPERO, PARROCCHIA, JARPA, PIZARRO e SILVA[2] afirmam peremptoriamente: "las comunicaciones brasileñas sobre este tema se han multiplicado en los ultimos anos, *no dejando dudas* de la relacion entre megaformaciones y enfermedad de Chagas".

Também na Inglaterra. SMITH[25] em seu livro "The Neuropathology of the Alimentary Tract" escreve: "A condition clinically identical with achalasia of the cardia, occurs in Chaga's disease associated with destruction of the myenteric plexus by *Trypanosoma cruzi*" (note-se que nunca foi demonstrada a "destruction of the myenteric plexus by *Trypanosoma cruzi*").

Crítica ao conceito de enteromegalia chagásica

Uma análise cuidadosa do problema e das provas apresentadas, não satisfaz o espírito de quem a ela se abalançar:

Vimos que as provas apresentadas de que a doença de Chagas produz destruição das células ganglionares do S. N. Central são irrelevantes e o próprio KOEBERLE as deixa de lado, preferindo não entrar em "pormenores sobre as neuropatias centrais do homem", achando mesmo que "é inútil procurar lesões à distância, quando o comprometimento nervoso periférico local mostra desaparecimento".

A explicação baseia-se no estudo das paredes dos órgãos tubulares, pelo qual chega à conclusão que as mesmas estão "desnervadas" — diminuição do número de neurônios intra-murais que, comparado ao dos órgãos normais, seria da ordem de 90%.

Para chegar a essa conclusão KOEBERLE[12] fez a contagem neuronal em: 33 esôfagos normais do Instituto Patológico de Viena; 30 esôfagos sem hiper-



trofia ou dilatações aparentes que chama "chagásicos" porque de portadores da doença de Chagas; 30 megaesôfagos que chama "chagásicos" por igual motivo; 15 megaesôfagos que chama "europeus" porque de europeus (e que pressupõe não serem "chagásicos").

Êsse estudo merece algumas críticas:

1. desprezou as células do plexo sub-mucoso de Meissner;

2. não refere o tempo de fixação do material, o que interfere no grau de retração do tecido;

3. de um anel de 5-6mm de altura, retirado ao nível da ampola esofágica, em cada caso fez 140 cortes transversais de 7 micra de espessura, montou e corou cada 7.º corte e nestes é que fez a contagem neuronal do plexo mioentérico; portanto, 20 cortes de cada órgão e apenas na ampola esofágica, perfazendo um total de apenas 140 micra de altura em cada caso, no espaço de 1mm, em um órgão que, normalmente, tem cerca de 25 cm de comprimento e que, em caso de megaesôfago, poderá ter muito mais do que isso;

4. não refere nos casos de megaesôfago o volume dos órgãos estudados ou a área total da parede e, assim, não refere os números obtidos a uma unidade que permita comparar os resultados (é evidente que conforme a dilatação do órgão o mesmo número normal de neurônios distribue-se por superfícies diferentes);

5. a inclusão foi feita em parafina, método desaconselhável para avaliação quantitativa de qualquer componente tecidual, sobretudo tecido nervoso, dadas as variações da retração dos tecidos em cada caso, por ser um método "a quente".

Em outro estudo, fez, pela mesma técnica (merecedora de reparos) a contagem neuronal do "esôfago terminal" (1/3 inferior) em sete níveis diferentes de 10 casos de megaesôfagos "chagásicos" e 2 "europeus".

Finalmente, tentou estabelecer um *padrão numérico* estudando tres esôfagos normais de 24 cm. de comprimento, cortados em 39 aneis com um intervalo de 5 mm entre eles. De cada anel estudou 20 cortes de 7 micra, na altura de 1 mm; também aqui não estabeleceu um padrão volumétrico ou de superfície que permitisse comparar os números obtidos com os dos casos de megaesôfago (a isso se destinava evidentemente o estudo).

6. explica a suposta destruição desses neurônios dos plexos intra-murais do tubo digestório por uma toxina que as leishmanias liberariam ao serem destruídas, mas não traz nenhuma prova da existência dessa toxina.

Chama "desnervação *vagal*" ao processo e, então, invoca a "lei da desnervação de Cannon" para explicar a hiperexcitabilidade das megaformações digestórias aos agentes colinérgicos (VIEIRA e GODOY[27]). Essa desnervação vagal encontrou aceitação entre autores como REZENDE, LAUAR e OLIVEIRA[24] para quem "As experiências de KRAMER e INGELFINGER e de BRASIL tornaram patente que o esôfago na síndrome conhecida por acalásia

do cárdia, cardiospasmo ou megaesôfago, acha-se bloqueado em relação à inervação vagal".

Vejamos se essa "lei" pode ser invocada, no caso:

A "lei de Cannon"[4] diz que: "Quando de uma série de neurônios aferentes, uma unidade é destruída, desenvolve-se acentuação da irritabilidade aos agentes químicos na estrutura ou estruturas isoladas, sendo máximo o efeito na parte diretamente desnervada". A respeito da sensibilização das células nervosas diz: "Os neurônios finais do sistema simpático, com células ganglionares nos gânglios do sistema, recebem impulsos das fibras pré-ganglionares. Nesta junção neuro-neuronal a acetilcolina serve de mediadora da transmissão, assim como o faz ao nível mio-neural nos músculos esqueléticos. Com efeito, os eventos que ocorrem nessas duas sinapses são sob muitos aspectos acentuadamente parecidos (cf. Rosenblueth e Cannon). É razoável, portanto, considerar os últimos neurônios simpáticos como sendo inervados pelos penúltimos. Surgiu, como decorrência, a questão: se as fibras pré-ganglionares são cortadas, os neurônios finais (pós-ganglionares) ficam sensibilizados aos estímulos químicos?" Após longa dissertação, conclui que os neurônios pós-ganglionares, carentes de fibras pré-ganglionares por secção ou degeneração, tornam-se sensibilizados igualmente ao agente estimulador natural, a acetilcolina (por falta de acetilcolinesterase). Portanto, a lei da desnervação de Cannon, pode ser invocada tanto na desnervação do plexo intramural como dos gânglios da cadeia para e pré-vertebral. O efeito final, sobre a musculatura do intestino é o mesmo.

Mas os experimentos de Cannon não foram feitos pela destruição dos plexos intramurais, se não que de fibras identificadas, ortossimpáticas ou parassimpáticas, que chegam aos gânglios simpáticos, e nunca de ambas concomitantemente, que é no que implica a lesão plexular.

Com efeito, ainda hoje se discute se as células ganglionares desses plexos são ou não exclusivamente parassimpáticas[6, 14, 15, 16, 23, 25, 28], mas o que não se discute é que as fibras ortossimpáticas, provenientes das porções gástricas e mesentéricas do plexo celíaco, passam pelos plexos de Auerbach (e de Meissner) e contribuem para a formação da rede plexular. Até hoje pouco se sabe acerca das relações sinápticas que se estabelecem nos ganglios destes plexos. Os conhecimentos atuais pouco acrescentaram em relação aos conceitos de LANGLEY[15, 16] do começo do século, para quem as fibras pós-ganglionares dos gânglios celíacos passam por esse plexo sem interrupção e terminam nas camadas musculares e glândulas do tracto gastro-intestinal e as fibras pré-ganglionares do vago é que provavelmente terminam em relações sinápticas com células destes pequenos gânglios, cujos axônios representariam fibras pós-ganglionares vagais que chegam à musculatura lisa e às glândulas.

Mas, mesmo que se admita que os neurônios desses plexos sejam vagais, a destruição dos gânglios plexulares não pode ser considerada de efeitos electivos para o vago. No dizer de KOEBERLE, a inflamação chagásica destrói o plexo e, *portanto,* seus neurônios vagais. Mas, e as fibras ortossimpáticas que por eles passam (mesmo que aí não façam sinapse)?

É evidente que, com a destruição dos gânglios dos plexos mioentéricos, haverá sempre destruição de componentes orto e parassimpáticos, o que torna aleatória qualquer argumentação que visa a provar o predomínio de um ou de outro dos dois setores simpáticos. Para isto, é necessário que se argumente com lesões de células ou de fibras pré-plexulares especificamente orto ou parassimpáticas.

É verdade que KOEBERLE afirmou, conforme referi, que "qualquer doença que comprometa a periferia neurovegetativa, seja sistematizada ou localizada pode... produzir dilatação dos órgãos musculares ocos" e, por periferia neurovegetativa, entende-se a cadeia neurônio medulo-ganglionar (pré-ganglionar), gânglio-visceral (pós-ganglionar) e plexos intra-murais. Mas, quando procura provar a hipótese, faz menção única e exclusivamente aos neurônios dos gânglios plexulares e quando afirma que "É inútil procurar lesões à distância quando o comprometimento nervoso periférico local mostra desaparecimento, se refere aos mesmos plexos.

Apesar de KOEBERLE ter estabelecido a comparação entre o megaesôfago brasileiro e o europeu apenas no plano patogenético, não resta dúvida que era sua obrigação, uma vez que ao megaesôfago "brasileiro" vinculou a doença de Chagas, comparar ambos no plano etiológico. Limitou-se, entretanto, a considerar a forma alienígena "de causa desconhecida".

Esse modo de encarar o problema aberra dos princípios da Patologia, pois:

ou o *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico determinante das megaformações e nesse caso não há como distinguir um megaesofago brasileiro de um europeu;

ou o *Trypanosoma cruzi* é apenas agente etiológico coadjuvante das megaformações e não há porque distinguir um megaesôfago brasileiro de um europeu, desde que o agente etiológico determinante poderá ser o mesmo.

Não julgo, portanto, a teoria de KOEBERLE e NADOR satisfatória para explicar a etiologia ou a patogenia dos "megas".

Outro autor nacional que estudou o problema das enteromegalias foi MAFFEI que, em algumas publicações e em numerosas aulas, palestras e conferências, divulgou a sua concepção, de que as megaformações toráeicas, abdominais e pélvicas dos órgãos ocos musculares são manifestações de alterações de desenvolvimento medulares, que se manifestam radiològicamente por "spina bifida" oculta.

Em 1951[17] simplesmente diz que entre outros sintomas da "spina bifida" oculta está o megacólon e o megaureter.

Em 1954[18] conclui um seu trabalho dizendo: "Os megas" não constituem simples acidente local do esôfago, do colon ou do ureter etc., mas um processo mais geral do organismo consistindo em uma alteração do desenvolvimento embrionário, não só do órgão mas também da medula espinhal ou de suas raízes e, portanto, um capítulo da Patologia Constitucional".

Para explicar o mecanismo patogênico refere que "a fisiologia nos ensina que a progressão do conteúdo do tubo digestivo se faz por meio de ondas peristálticas constituídas pela sucessão de contrações da túnica muscular em um segmento e relaxamento do segmento imediato. Esse mecanismo se realiza automaticamente pela ação do sistema nervoso: as contrações são determinadas pelo sistema nervoso autônomo representado não só pelos plexos existentes na parede do próprio tubo digestivo como também pelos gânglios do sistema simpático que, por sua vez, estão em conexão com o eixo cérebro-espinhal. O relaxamento dos diferentes segmentos é determinado pelo sistema nervoso central cujos centros estão escalonados desde o bulbo até a medula sagrada. Desse modo, enquanto um segmento recebe o estímulo simpático e se contrai, o segmento imediato recebe o estímulo do sistema nervoso central, relaxando-se e assim por diante, resultando a progressão do conteúdo. Por conseguinte, se nos megas o segmento abaixo da dilatação permanece fechado é porque lhe falta o mecanismo de abertura, dependente do sistema nervoso central".

Em 1967[19] escreve: "Já vimos que estas anomalias (os megas) estão relacionados à spina bifida oculta, fato este comprensível sabendo-se que no desenvolvimento embrionário a extremidade caudal da medula se continua com o intestino primitivo, constituindo o canal neuro-entérico..."

Apesar da carência de base na Anatomia do Sistema Nervoso Autônomo e na Embriologia do Sistema Neural de cada uma das hipóteses patogênicas aventadas por MAFFEI, apesar do A. nunca ter apresentado dados estatísticos para dizer em quantas observações se baseava seu conceito; apesar de publicar apenas algumas raras fotografias de cortes de medulas mal-formadas, o que evidenciava não ter êle submetido sua hipótese aos rigores de um estudo sistemático, resolvi pesquisar essa teoria não aventada por outros autores, uma vez que os centros nervosos neuro-vegetativos (orto e parassimpáticos) se localizam no eixo cérebro-espinhal (v. fig. 69), desde o hipotálamo à medula sagrada, constituídos pela substância acinzenta peri-ependimária que reveste o 3.º ventrículo, o aqueducto de Sylvius, o 4.º ventírculo e todo o canal do epêndima, e que a sua parte periférica motora se inicia por núcleos do tronco cerebral e da medula. Era, pois, possível que alterações de desenvolvimento medulares pudessem estar implicadas em um mecanismo patogênico do qual evidentemente participa o S. N. Autônomo, que levasse ao aparecimento das megaformações dos órgãos tubulares digestivos, desde que as tentativas feitas pelo estudo dos componentes intramurais desse mesmo Sistema não havia, a meu ver, esclarecido o assunto.

Assim, estudei de maneira sistemática as medulas dos portadores de megacólon por mim autopsiados no Hospital Psiquiátrico Juqueri.

Inicialmente, o estudo destinou-se a verificar genericamente a existência de alterações de desenvolvimento. No decorrer dele observei flagrantes lesões disgenéticas e adquiridas dos centros simpáticos medulares e, ao final, revi todo o material para me deter no estudo de tais centros. Os resultados dessa revisão constituíram-se em contribuição original ao esclarecimento da etiologia e da patogenia da doença.



MATERIAL E MÉTODO

1. O material constou das medulas espinhais de 21 casos de megacólon.

2. As medulas, após fixação de 60 dias em formalina a 10%, foram clivadas em segmentos de aproximadamente 1 cm cada. Em média, cada medula deu 40 segmentos, que foram numerados no sentido caudal-cefálico (exceto o caso 17 que o foi no sentido inverso), incluídos em celoidina e microtomizados com 30 micra de espessura.

Exceto no caso 21, todas as medulas eram completas, da transição com o bulbo ao cone terminal.

De cada bloco foram montados pelo menos 4 cortes, dois corados pelo método de Nissl para o pirenóforo e dois, pela variante de Erhardt do método Pal-Weigert para fibras mielínicas.

Ao todo, o material estudado se constitui de aproximadamente 4.000 preparações histológicas.

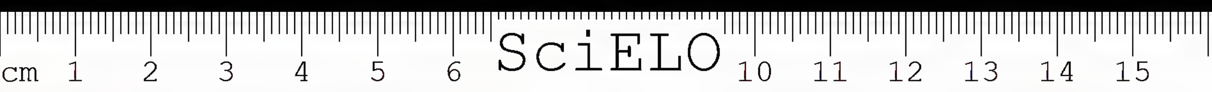
3. Excetuados os casos de diastematomielia, completa ou incompleta, as demais alterações arquitetônicas encontradas não permitiram classificação pois eram na maioria das vezes bizarras, em conseqüência das mais variadas perturbações da migração e diferenciação dos neuroblastos. Isso obrigou-me a classificá-las arbitrariamente em: 1) arquitetura profundamente alterada; 2) alterada; 3) discretamente alterada e 4) quase normal.

4. Nas medulas com lesões somente disgenéticas, ainda que tenha examinado todas as lâminas, descrevi as coradas pelo método de Nissl apenas nos casos ou nos segmentos em que as disgenesias, não sendo grosseiras, permitiram o estudo cito-arquitetônico.

Nas medulas com lesões somente adquiridas, essa descrição foi sistemática.

5. Para caracterizar u'a medula como disgenética foi necessário excluir possíveis artifícios de técnica, particularmente dois: inclinação do plano de corte e trações. Para bem entender os efeitos da inclinação do plano de corte sobre a configuração da secção medular, fiz moldes de madeira (subst. branca) e gesso (subst. cinzenta) das principais alturas (cervical, torácica, lombar e sagrada), que foram serrados segundo os diferentes planos inclinados (fig. 70 a 80). Ficou evidenciado que tal inclinação não produz figuras assimétricas, como as das figs. 36, 39, 43, 53 e 66, a não ser que a inclinação seja tal que o plano atinja a superfície superior ou inferior do bloco, caso em que necessariamente o corte apresenta o seu contorno elíptico ou circular interrompido por uma linha reta (arco de corda, figs. 77, 78, 79 e 80).

Quanto às trações, o método que se mostrou mais seguro foi o do estudo da morfologia dos corpos celulares dos neurônios, pois, quando o tecido nervoso é tracionado, tais corpos se apresentam todos alongados em uma só



direção. Por exemplo, na fig. 40, os pirenóforos são os dos neurônios do corno anterior da medula da fig. 39-B e não apresentam essa ou outra deformidade. Isso permite excluir que a configuração alongada em direção transversal desse corno anterior se deve a uma tração em sentido lateral.

Mesmo convencido da natureza disgenética de uma determinada alteração arquitetônica, somente a descrevi como tal quando tinha elementos que pudessem disso convencer qualquer espírito, mesmo o mais céptico. Preferi considerar como normais figuras que por minha longa prática do exame de medulas me davam a impressão de alteração arquitetônica disgenética, mas que podiam ser contestadas por alguém não afeito a tais aspectos. Quando a convicção subjetiva foi muito forte e as objeções não podiam merecer esclarecimento cabal, preferi deixar uma interrogação.

6. As lâminas foram estudadas e descritas uma a uma. A conclusão sôbre cada uma foi baseada no seu exame isolado, para que os achados em outras lâminas não influíssem na apreciação do corte em observação. A não ser assim, a descrição das lâminas 14 e 36 a 38 do caso 8 (figs. 32 a 35) não traria uma interrogação, pois as lâminas 5, 6, 7, 8 e 9 do mesmo (figs. 27 a 31) poderiam coonestar a opção por uma alteração arquitetônica do desenvolvimento naqueles cortes.

7. Não foi feita a identificação (a partir das raízes) da altura de cada segmento medular por ocasião da clivagem do material, mas a sua numeração foi seguida, de modo que, na maioria das vezes, foi possível identificar não só a altura (cauda, sagrada, lombar, toráeica ou cervical) do segmento como sua localização mais cefálica ou mais caudal em relação aos demais da mesma altura. Quer dizer, as lâminas e segmentos 17 e 19 por exemplo, são respectivamente mais caudal e mais cefálica do que a do segmento 18. É óbvio que os números seguidos correspondem a segmentos vizinhos. Houve casos, porém, em que o corte apresentava arquitetura tão alterada que não permitia identificar a altura e as lâminas imediatamente precedente e procedente eram de alturas diferentes; assim, fiquei sem poder identificar a altura do segmento observado. Nas tabelas da casuística, tais casos aparecem com interrogação na coluna das alturas medulares.

8. Os principais elementos de que me vali para avaliar a existência de uma alteração do desenvolvimento embrionário foram:

1. forma, em seu conjunto;

2. presença de células nervosas nas estruturas apensas (figs. 2, 3, 15, 17), protrusas (fig. 1) e acoladas (figs. 25, 26, 43 e 44) à formação medular principal;

3. forma dos pirenóforos nos casos sugestivos de tração (figs. 39-B e 40);

4. direção das fibras nervosas (fig. 47);



5. população neuronal dos núcleos medulares; como não existem padrões estabelecidos na raça humana, me guiei pela comparação com medulas normais e entre os dois lados da medula em estudo; os resultados foram expressos em "rarefacção celular" e "ausência" de um determinado núcleo; este estudo, como se percebe facilmente na Casuística, foi dirigido para as estruturas cinzentas simpáticas, por motivos que explicarei na Discussão.

9. Adotei a seguinte nomenclatura:

9.1 — Arquitetura normal — ausência de lesões disgenéticas.

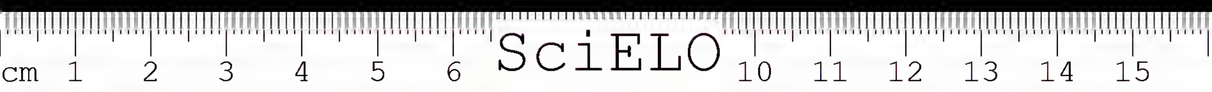
9.2 — Aquitetura alterada (profundamente, simplesmente ou discretamente) e quase normal — presença de lesões disgenéticas.

9.3 — Segmento — segmento resultante da clivagem (bloco).

9.4 — Altura (Ca, S, L, T e C) — um dos grandes segmentos metaméricos da medula: cauda, sagrada, torácica ou dorsal e cervical.

9.5 — Centros simpáticos — centros neuro-vegetativos ou autônomos (orto e parassimpáticos).

9.6 — N — coloração pelo método de Nissl para o corpo celular do neurônio; E — coloração pelo método de Erhardt (variante do Weigert-Pal) para fibras mielínicas; LAM (lâmina) — número do segmento da medula, resultante da clivagem; COL — método de coloração; ALT — altura (v. 9.4).



CASUÍSTICA

CASO 1

LAM	COL	AET	
2	E	S	Duas porções: de um lado, S-5 com raízes ao redor; do outro, somente feixe de raízes.
3	E	?	Formação única, com profunda alteração da forma e da disposição das substâncias branca e cinzenta.
4	E	?	Medula dupla (diastematomielia): ambas as porções de forma muito alterada.
5	E	?	Formação única, com acentuada alteração da forma, apesar da qual aparece o H de substância cinzenta.
6	E	?	Diastematomielia: uma das porções tem morfologia de medula; a outra é apenas rudimentar.
7	E	?	Formação única com morfologia de medula, que, entretanto, tem dois fascículos conspícuos no funículo posterior.
8/9	E	?	Diastematomiella: uma das porções tem morfologia de medula; a outra é apenas rudimentar.
10/15	E	T	Formação única, praticamente normal, apenas de volume aumentado a expensas da substância branca.
16/28	E	T	Formação única, de volume aumentado a expensas da substância branca, com alterações das colunas intermédio-laterais, traduzidas por aplasia ou hipoplasia de uma ou de ambas as espículas laterais.
29	E	C	Aplasia de uma das espículas laterais (deve ser altura C-8).
30	E	C	Mal-formação ou defeito de técnica?



Fig. 1. Caso 1, lâm. 3. Aum. 10x.

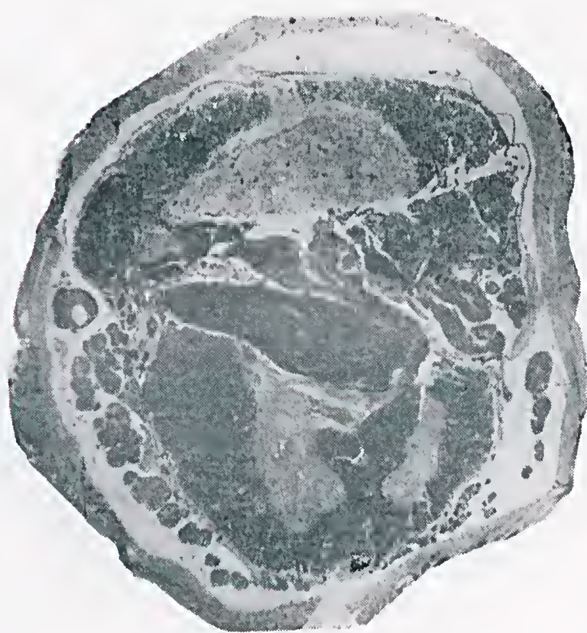


Fig. 2. Caso 1, lâm. 6. Aum. 6,5x.

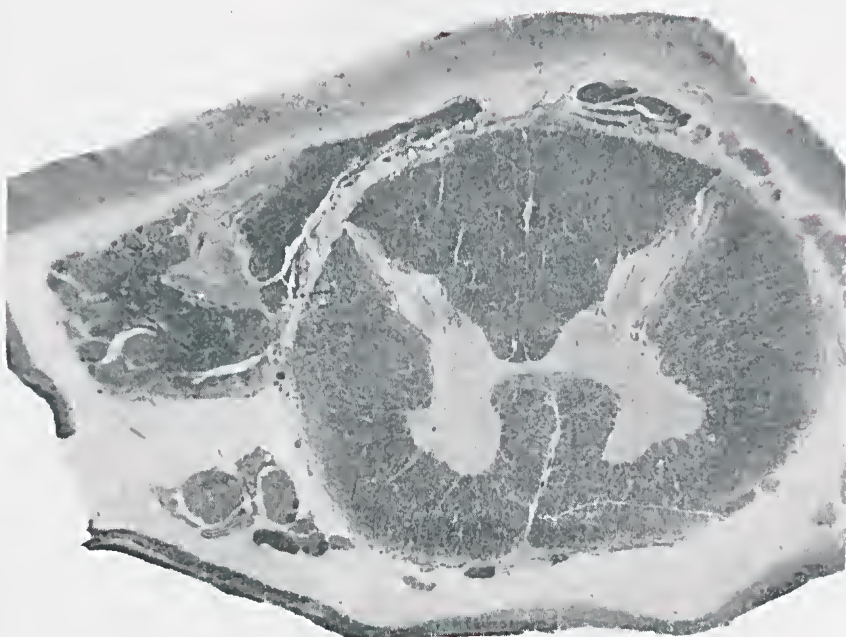


Fig. 3. Caso 1, lâm. 9. Aum. 8x.



Fig. 4. Caso 1, lâm. 13. Aum. 10x.

CASO 2

L A M	C O L	A L T	
1/2	E	S	Arquitetura normal.
3/8	E	L	——— " ———— " ——
9	E	T	——— " ———— " ——
11	E	T	——— " ——— alterada.
12/17	E	T	——— " ——— profundamente alterada.
18	E	T	Ausência de uma espícula lateral.
19	E	T	Espículas laterais apenas esboçadas.
20	E	T	Espículas laterais apenas esboçadas.
21/22	E	T	Arquitetura praticamente normal.
23	E	T	Ausência de uma espícula lateral.
24	E	T	Espículas laterais praticamente ausentes.
25/26	E	T	Ausência de uma espícula lateral.
27	E	T	Arquitetura alterada: massa de tecido nervoso (em que foram vistas células nervosas) em forma de crescente, apoiada lateralmente.
28/30	E	?	Arquitetura profundamente alterada (*impossível* confusão com artifício de técnica).
31/32	E	C	Arquitetura profundamente alterada (*impossível* confusão com artifício de técnica).

Observação — Há em todas as alturas desmielinização do feixe piramidal cruzado de um dos lados.

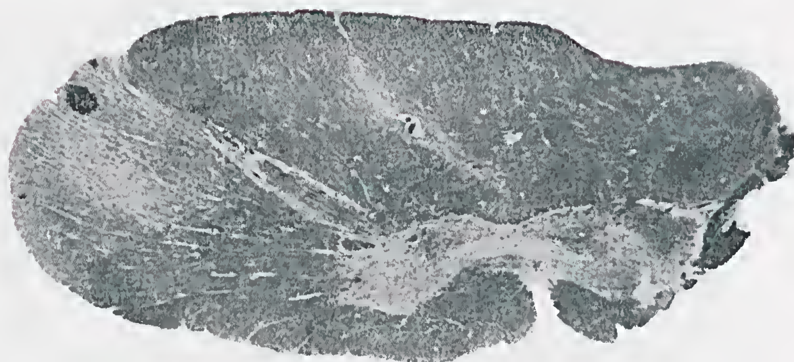


Fig. 5. Caso 2, lâm. 14. Aum. 16x.

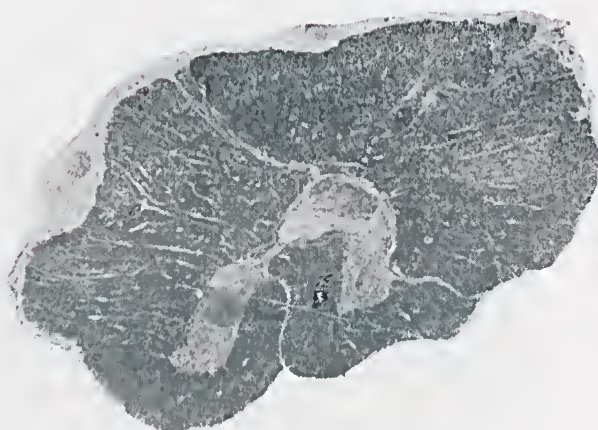


Fig. 6. Caso 2, lâm. 17. Aum. 11x.

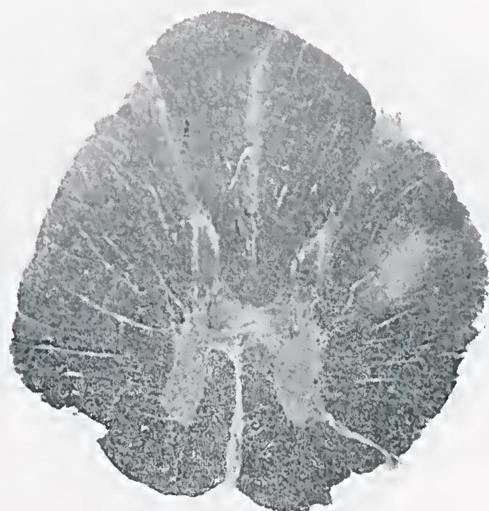


Fig. 7. Caso 2, lâm. 21. Aum. 10x.

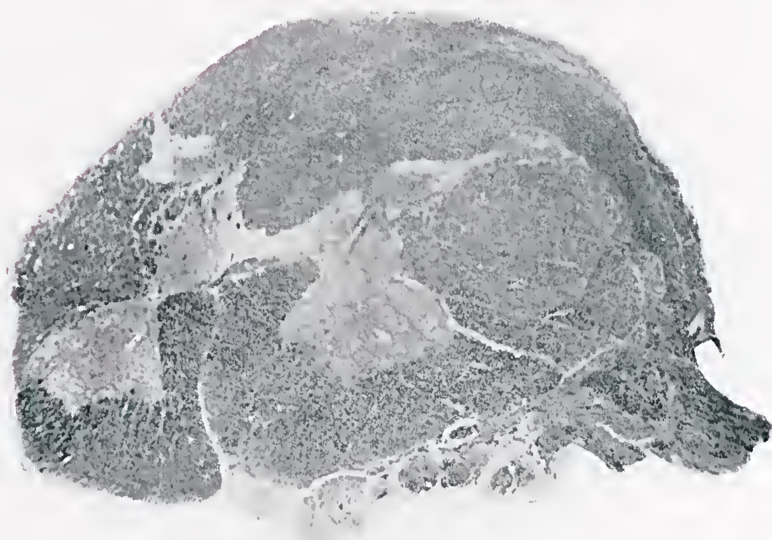


Fig. 8. Caso 2, lâm. 32. Aum. 8x.

CASO 3

L A M	C O L	A L T	
1	E	S	Arquitetura profundamente alterada ou artifício de técnica?
2	E	S	Arquitetura profundamente alterada.
3/4	E	L	——— " ——— quase normal.
5/12	E	T	——— " ——— discretamente alterada (espículas laterais apenas esboçadas de um ou de ambos os lados).
13	E	T	Arquitetura alterada.
14/15	E	T	——— " ——— normal.
16/22	E	T	——— " ——— discretamente alterada (como em 5/12).
23	E	T	Arquitetura alterada.
24/26	E	T	Arquitetura praticamente normal.
27/30	E	C	——— " ——— " ——— " ———
31/32	E	C	——— " ——— profundamente alterada.

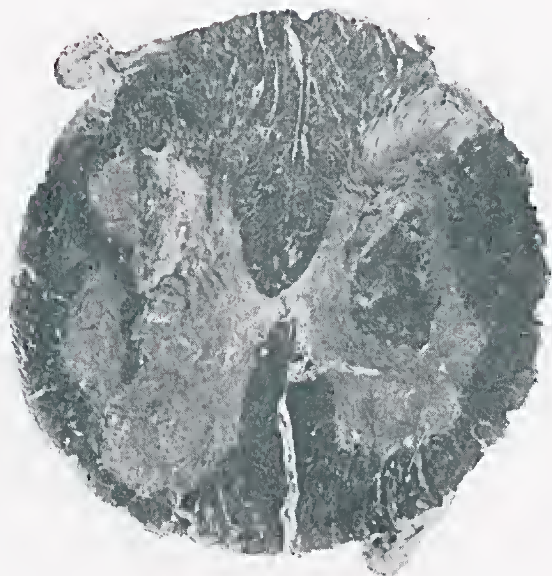


Fig. 9. Caso 3, lâm. 2. Aum. 10x.

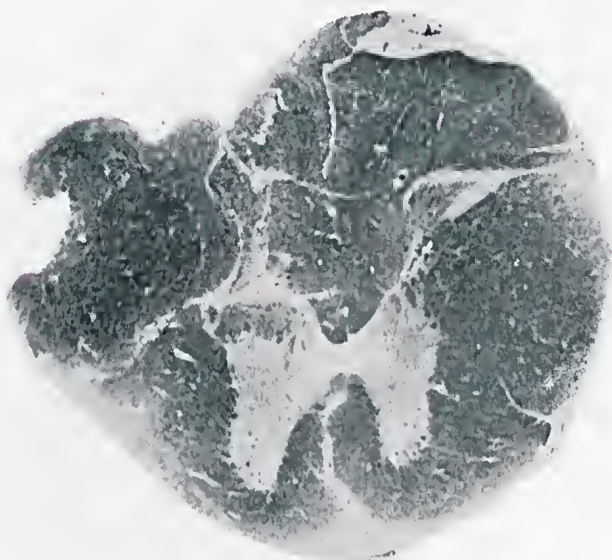


Fig. 10. Caso 3, lâm. 31. Aum. 11x.

CASO 4

L A M	C O L	A L T	
1/4	E	Ca	Nada digno de nota.
5/7	E	S	Arquitetura normal.
8/9	E	L	——— " ———— " ——
10	E	L	——— " ——— quase normal.
11	E	L	——— " ——— alterada.
12/13	E	L	——— " ——— profundamente alterada.
14	E	L	——— " ———— " ——— " ——— (tipo diastematomielia).
15	E	T	Arquitetura profundamente alterada (há um crescente recobrindo a face posterior da medula, destacado dela, constituído por tecido nervoso — presença de células nervosas nos cortes corados pelo método de NISSL).
16	E	T	Arquitetura alterada.
17	E	T	Ausência das espículas laterais.
17	N	T	Presença dos núcleos intermédio-laterais (estando o de um lado no corno posterior).
18	E	T	Arquitetura discretamente alterada: de um lado, corno anterior muito menor (que do outro) e ausência da espícula lateral.
19	E	T	Arquitetura alterada.
20/21	E	T	Espículas laterais apenas esboçadas.
20/21	N	T	Núcleos intermédio-laterais rarefeitos.
22	E	T	Uma espícula lateral apenas esboçada e outra ausente.
22	N	T	De um lado, núcleo intermédio-lateral muito rarefeito; de outro, no corno posterior.
23	E	T	Arquitetura profundamente alterada (tipo diastematomielia).
24	E	T	Arquitetura profundamente alterada.
25	E	T	Espículas laterais apenas esboçadas e nos cornos posteriores.
25	N	T	Núcleos intermédio-lateris rarefeitos, mais o de um dos lados.
26	E	T	Arquitetura normal.
27/28	E	T	Espículas laterais nos cornos posteriores e uma delas apenas esboçada.
27/28	N	T	Núcleos intermédio-laterais rarefeitos.
29/30	E	T	Espículas laterais nos cornos posteriores.
29/30	N	T	Um dos núcleos intermédio-laterais rarefeito.
31/32	E	T	Espículas laterais nos cornos posteriores.
31/32	N	T	Núcleos intermédio-laterais normais.
33/35	E	C	Arquitetura alterada.
36/38	E	C	——— " ——— normal.
39/41	E	C	——— " ——— profundamento alterada.
42/44	E	C	——— " ——— normal.

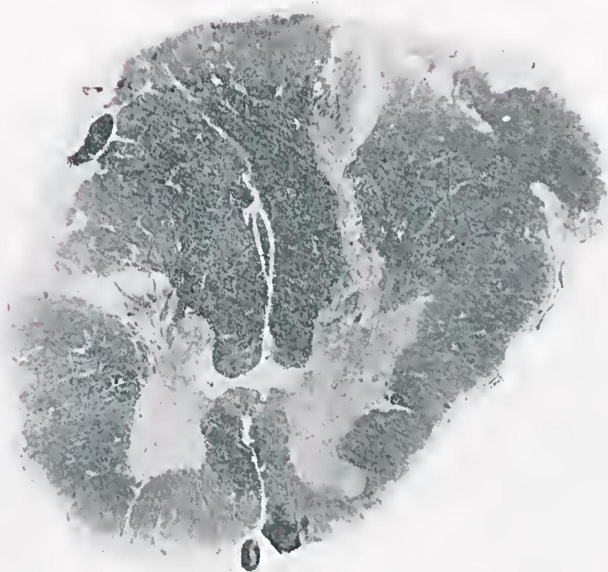


Fig. 11. Caso 4, lâm. 11. Aum. 7,5x.

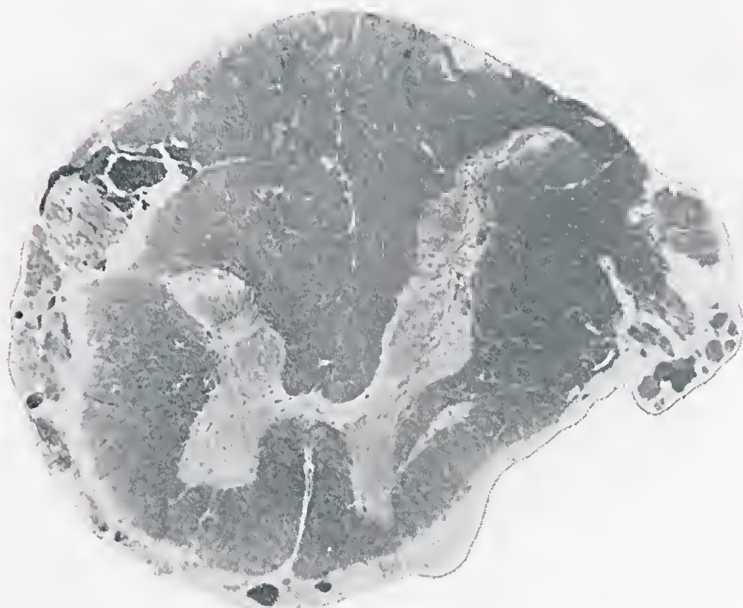


Fig. 12. Caso 4, lâm. 12. Aum. 7,5x.

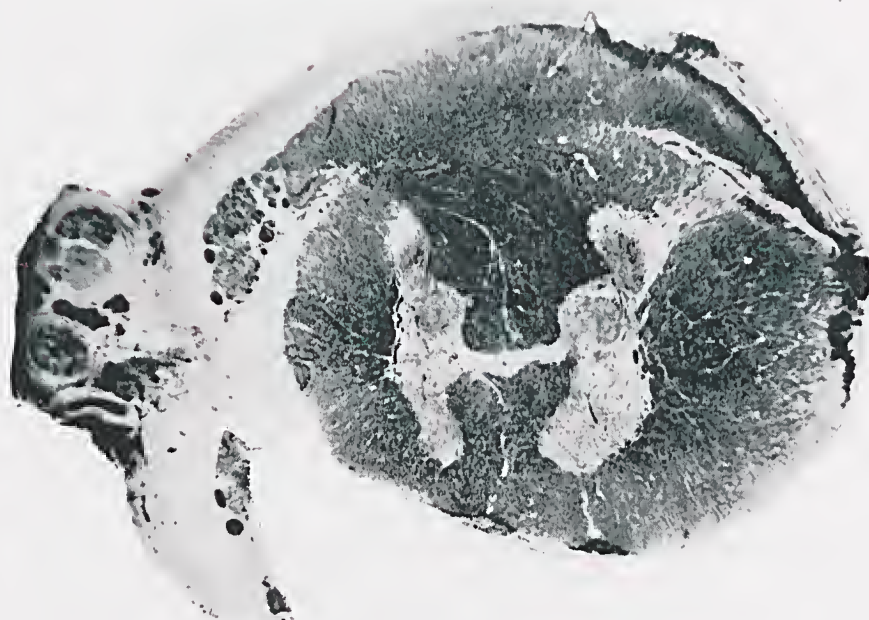


Fig. 13. Caso 4, lâm. 13. Aum. 8x.

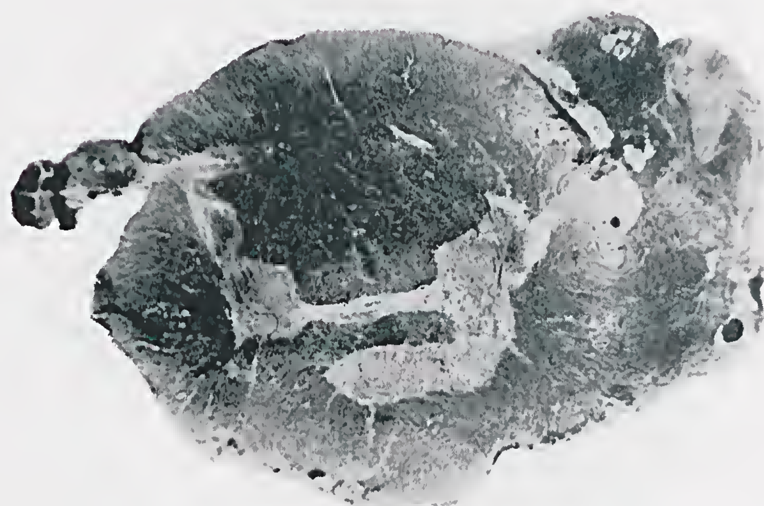


Fig. 14. Caso 4, lâm. 14. Aum. 8x.

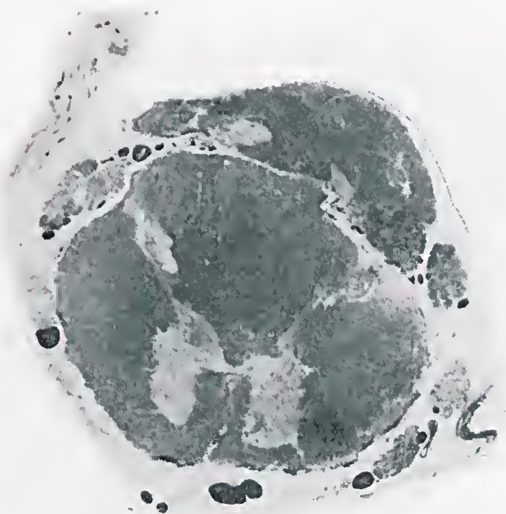


Fig. 15. Caso 4, lâm. 15. Aum. 7x.

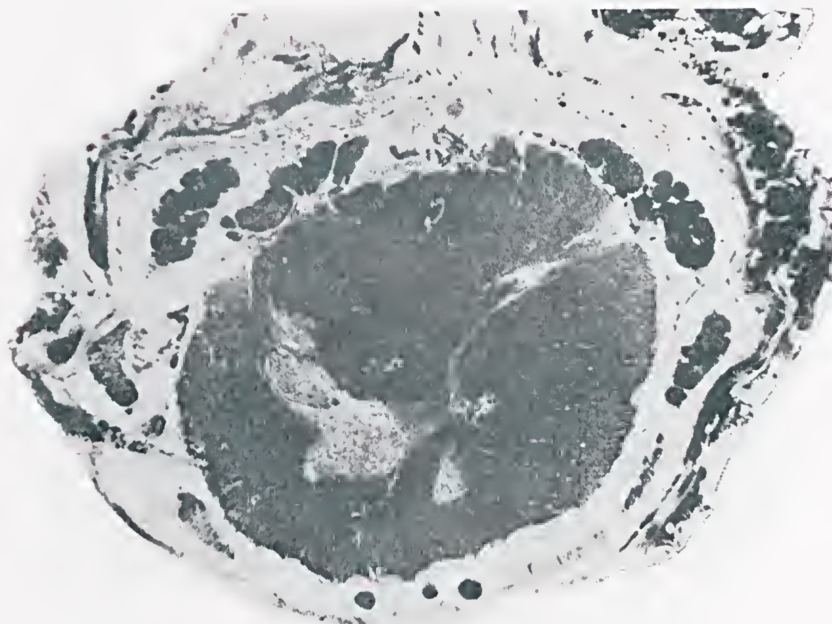


Fig. 16. Caso 4, lâm. 19. Aum. 10x.

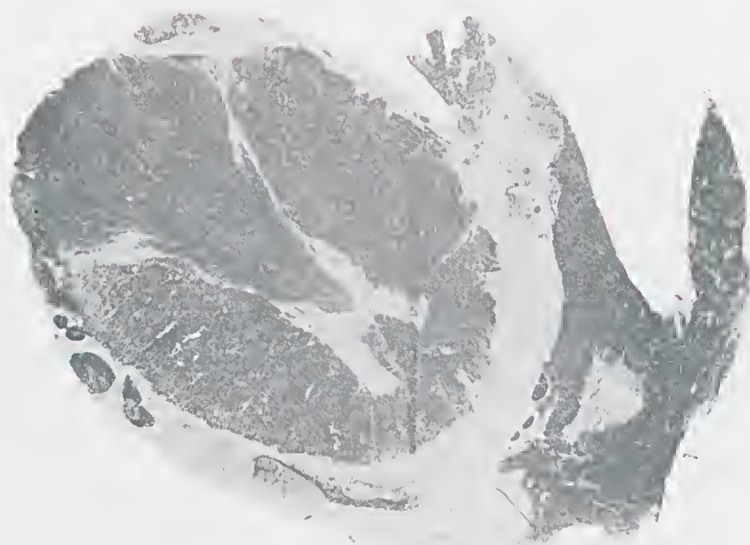


Fig. 17. Caso 4, lâm. 23. Aum. 9,5x.

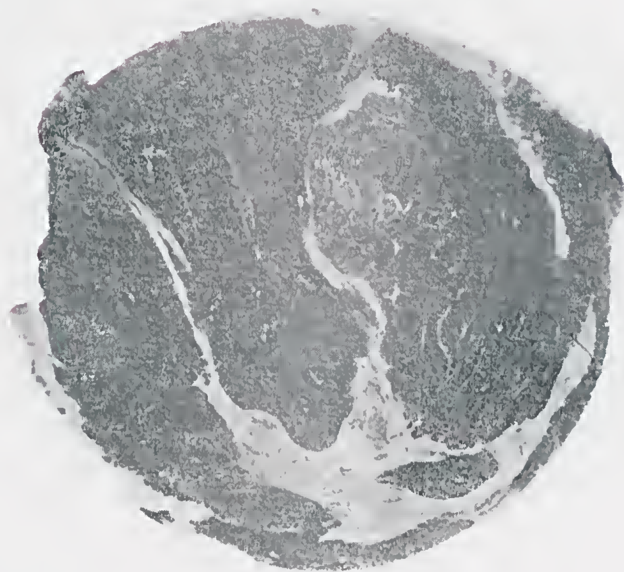


Fig. 18. Caso 4, lâm. 24. Aum. 8x.

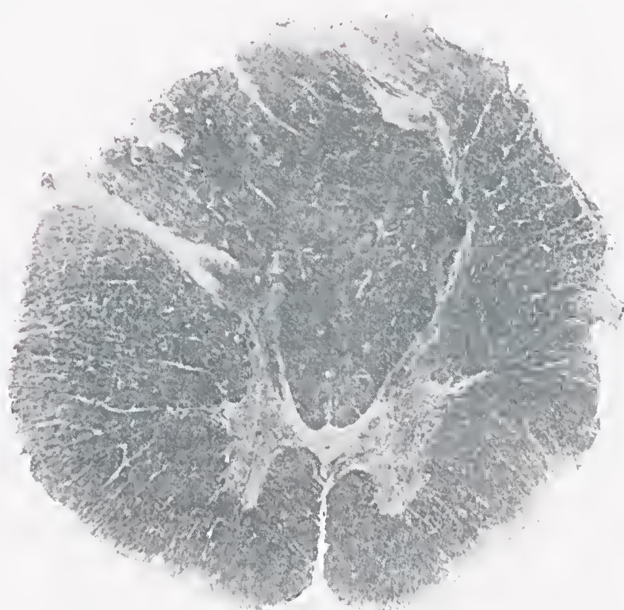


Fig. 19. Caso 4, lâm. 33. Aum. 9x.

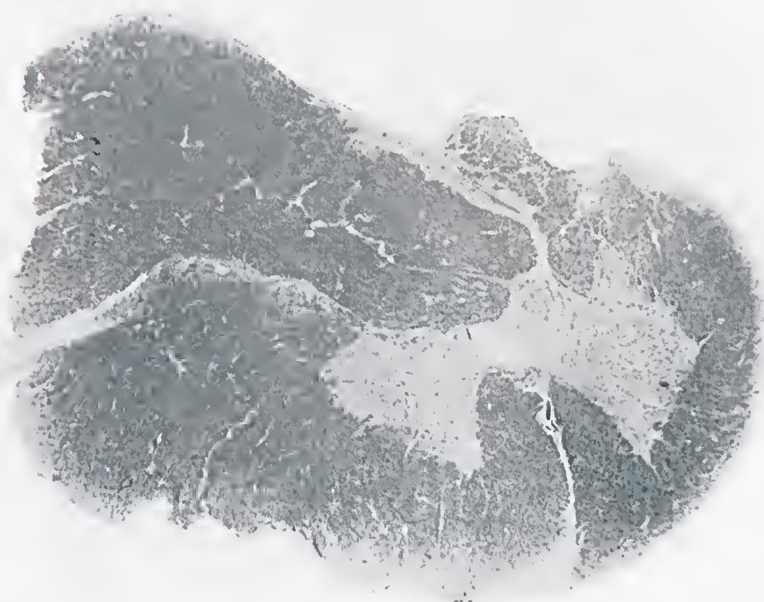


Fig. 20. Caso 4, lâm. 40. Aum. 10x.

CASO 5

L A M	C O L	A L T	
1/2	E	S	Arquitetura normal.
3/5	E	L	——— " ——— " ———
6	E	T	——— " ——— " ———
7	E	T	Uma espícula lateral apenas esboçada.
8/9	E	T	Espículas laterais apenas esboçadas.
8/9	E	T	Núcleos intermédio-laterais rarefeitos.
10	E	T	Arquitetura discretamente alterada.
11/12	E	T	Espículas laterais apenas esboçadas.
13	E	T	Arquitetura normal.
14	E	T	——— " ——— alterada.
15	E	T	Ausência de uma espícula lateral.
17	E	T	Uma espícula lateral no corno posterior.
18	E	T	Uma espícula lateral no corno posterior, outra apenas esboçada.
19	E	T	Uma espícula lateral no corno posterior; ambas apenas esboçadas.
20	E	T	Uma espícula lateral apenas esboçada.
21	E	T	Arquitetura normal.
22	E	C	——— " ——— " ———
23	E	C	——— " ——— discretamente alterada.
24	E	C	——— " ——— alterada.
25/27	E	C	——— " ——— profundamente alterada (tipo diastematomielia).

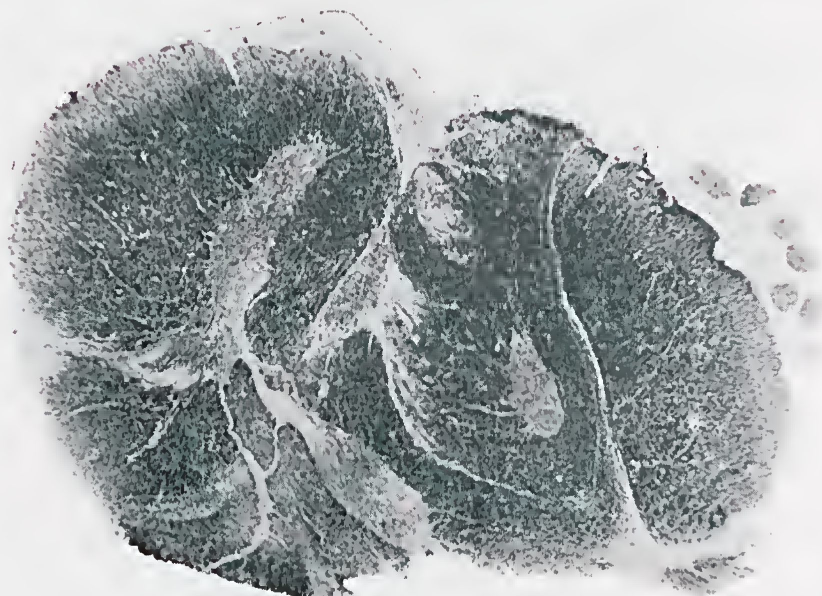


Fig. 21. Caso 5, lâm. 26. Aum. 8x

CASO 6

LAM	COL	ALT	
1/7	E	Ca	Nada digno de nota.
8/10	E	S	Arquitetura normal.
11/15	E	L	——— " ———— " ——
16/23	E	T	——— " ———— " ——
24/30	E	T	Ausência de uma espícula lateral.
31	E	T	Arquitetura quase normal.
32/44	E	T	——— " ——— normal.
45/47	E	C	——— " ——— profundamente alterada.
48/50	E	C	——— " ——— alterada.
51/52	E	C	——— " ——— normal.

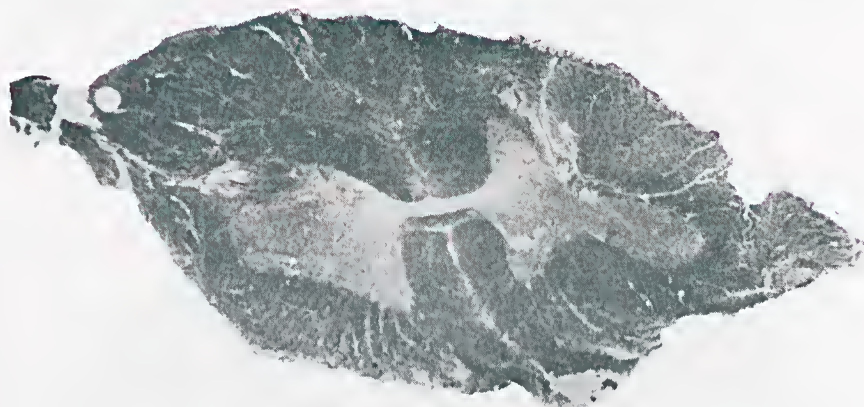


Fig. 22. Caso 6, lâm. 45. Aum. 9,5x.

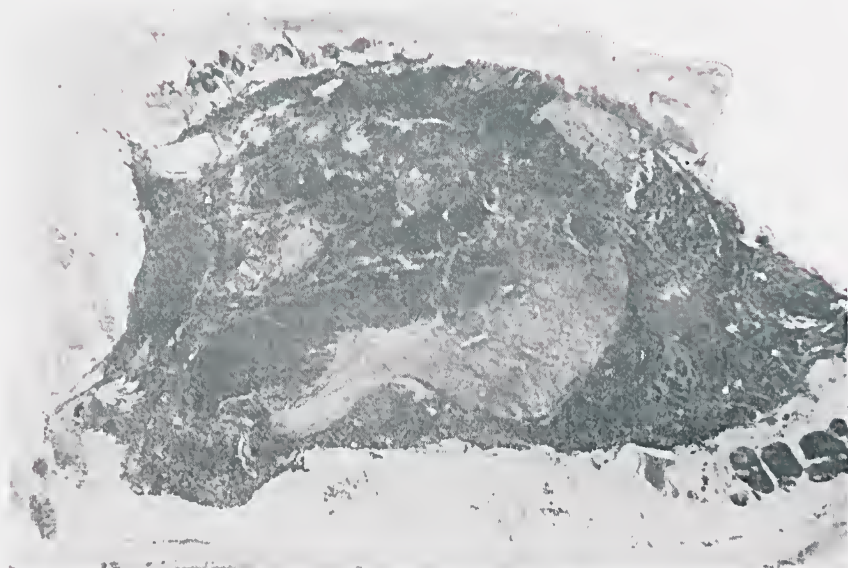


Fig. 23. Caso 6, lâm. 46. Aum. 10x.

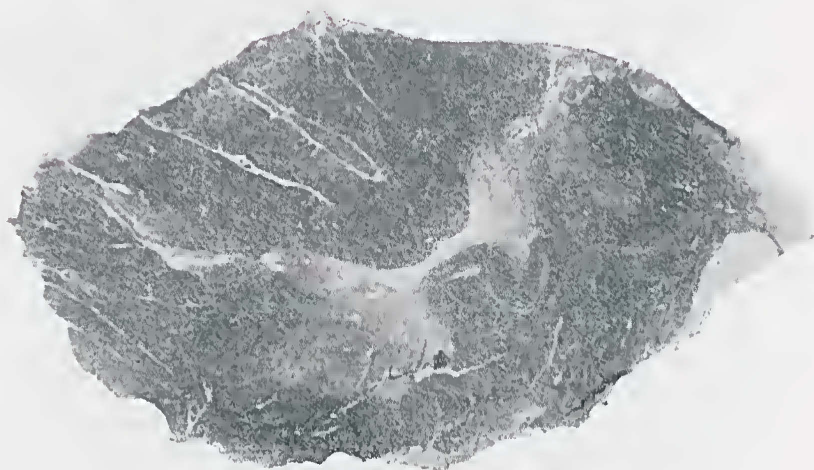
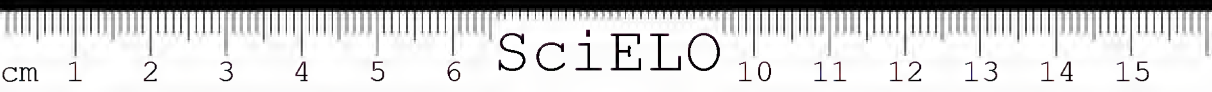


Fig. 24. Caso 6, lâm. 47. Aum. 9x.

CASO 7

L A M	C O L	A L T	
1/9	E	Ca	Nada digno de nota.
10/12	E	S	Arquitetura normal.
13/15	E	L	——— . ———— " ——
16/29	E	T	——— . ———— " ——
30/31	E	C	——— . ———— " ——
32	E	C	——— " ——— quase normal.
33	E	C	——— " ——— discretamente alterada.
34/35	E	C	——— " ——— profundamente alterada.
36	E	C	——— " ——— alterada.
37	E	C	——— " ——— discretamente alterada.
38	E	C	——— " ——— profundamente alterada.



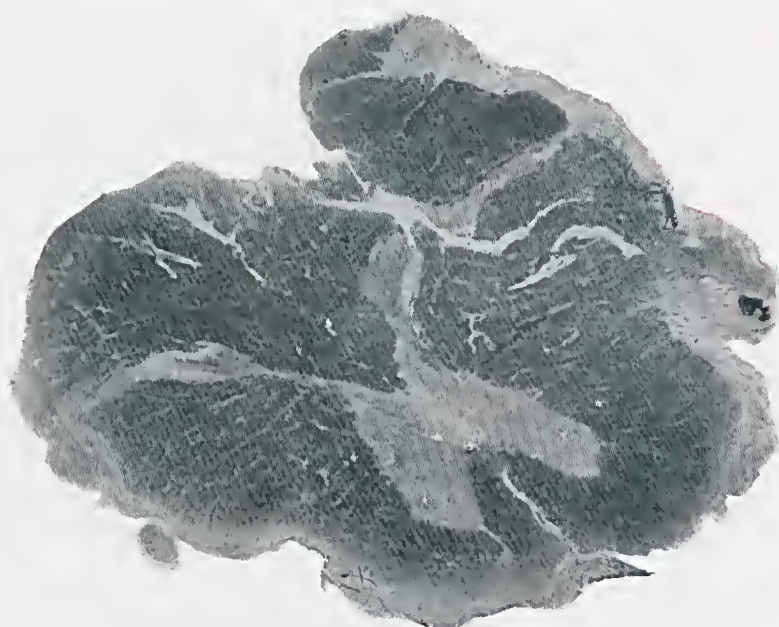


Fig. 25. Caso 7, lâm. 35. Aum. 8,5x.

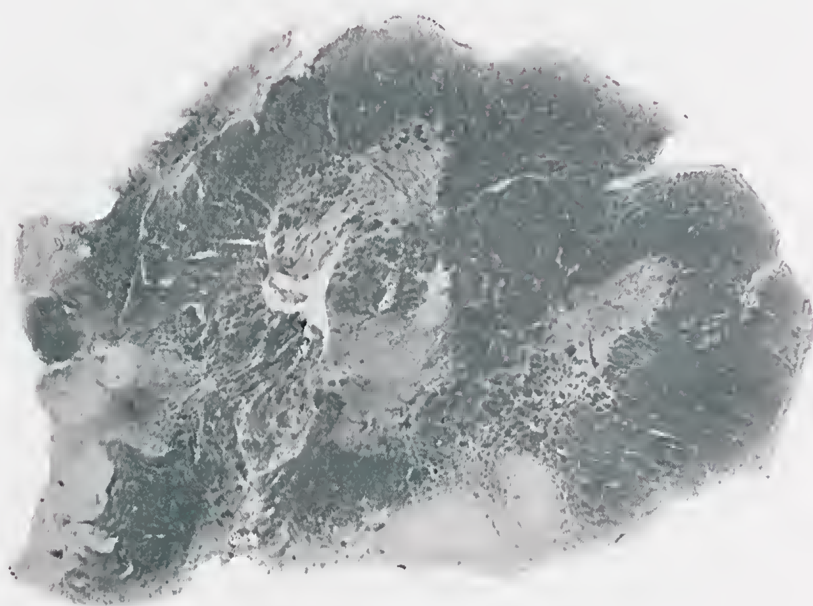


Fig. 26. Caso 7, lâm. 38. Aum. 10x.

CASO 8

L A M	C O L	A L T	
1	E	Ca	Nada digno de nota.
2/4	E	S	Arquitetura normal.
5/9	E	L	——— " ——— profundamente alterada (tipo diastematomielia).
10/12	E	T	Arquitetura normal.
13	E	T	Uma espícula lateral no corno posterior.
14	E	T	Arquitetura alterada ou artifício de técnica?
15	E	T	——— " ——— normal.
16/17	E	T	Uma espícula lateral no corno posterior.
18/19	E	T	Espículas laterais nos cornos posteriores.
20/21	E	T	Espículas laterais nos cornos posteriores, sendo uma menor do que a outra.
22/25	E	T	Espículas laterais nos cornos posteriores.
26	E	T	Uma espícula lateral no corno posterior e menor do que a outra.
27	E	T	Arquitetura alterada.
28	E	T	Espículas laterais nos cornos posteriores.
29	E	T	Arquitetura praticamente normal.
30/34	E	C	——— " ——— normal.
35	E	C	Não pode ser avaliada.
36/38	E	C	Arquitetura profundamente alterada ou artifício de técnica?

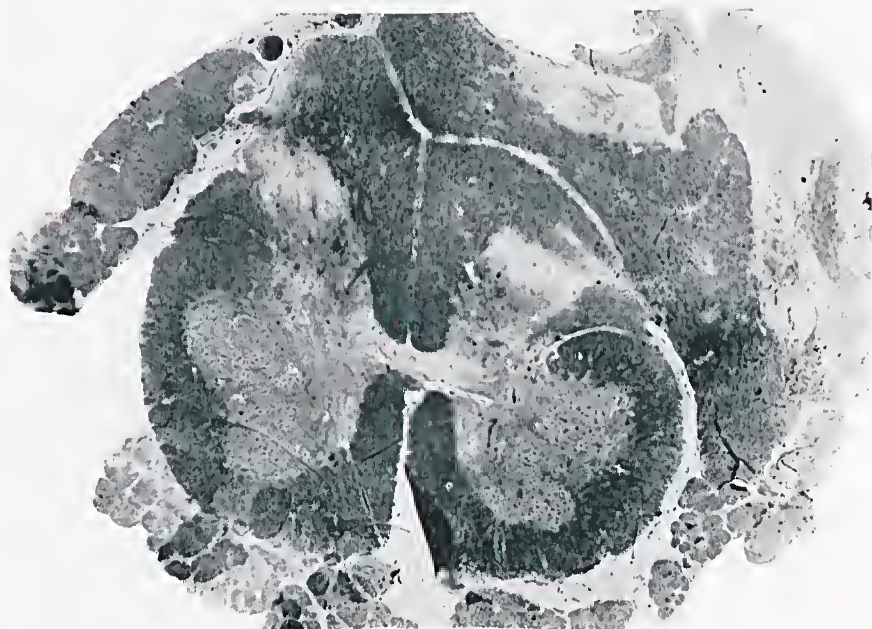


Fig. 27. Caso 8, lâm. 5. Aum. 9x.

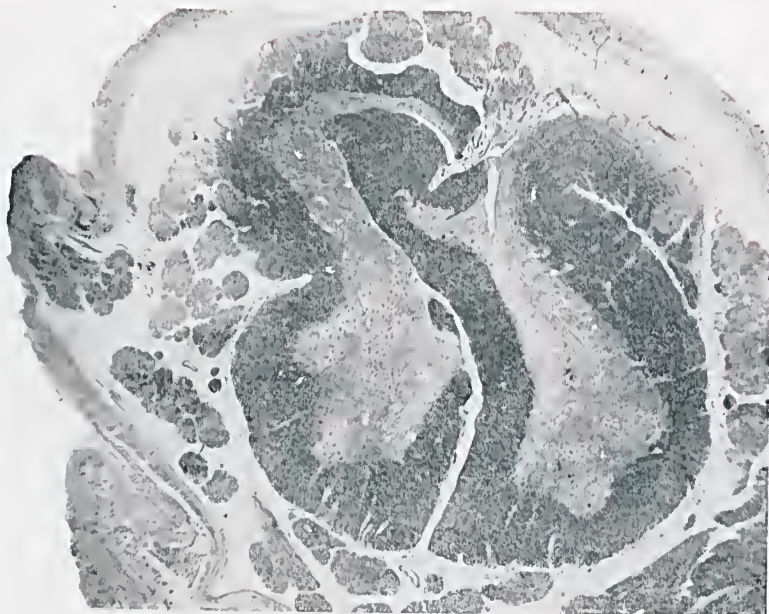


Fig. 28. Caso 8, lâm. 6. Aum. 7,5x.

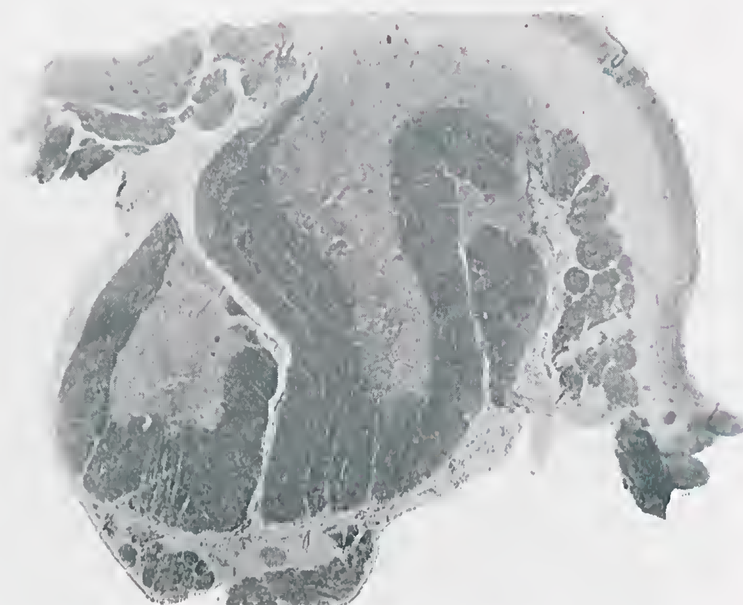


Fig. 29. Caso 8, lâm. 7. Aum. 10x.



Fig. 30. Caso 8, lâm. 8. Aum. 7x.

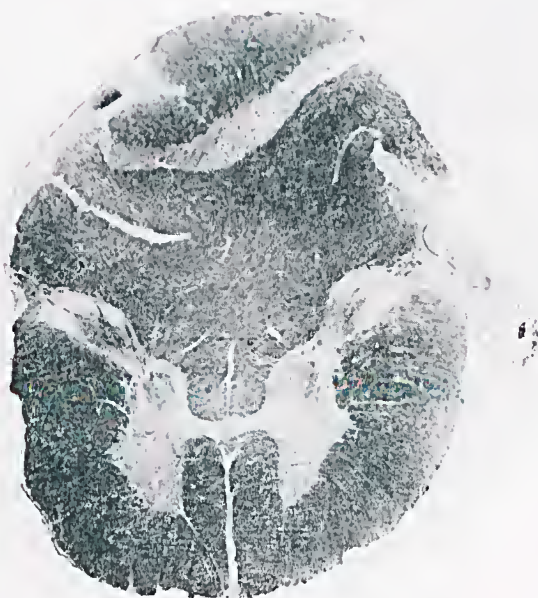


Fig. 31. Caso 8, lâm. 9. Aum. 7,5x.



Fig. 32. Caso 8, lâm 14. Aum. 9,5x.

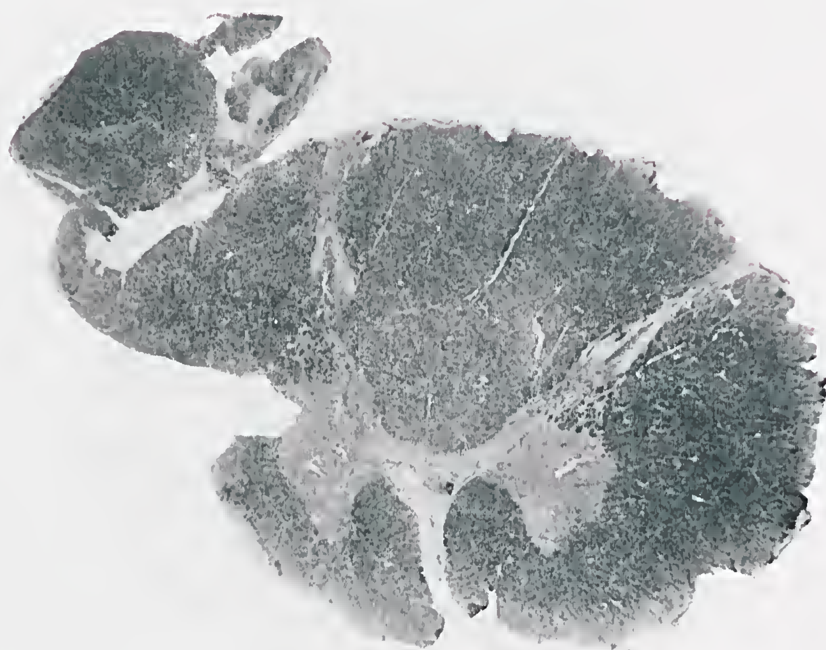


Fig. 33. Caso 8, lâm. 36. Aum. 8,5x.

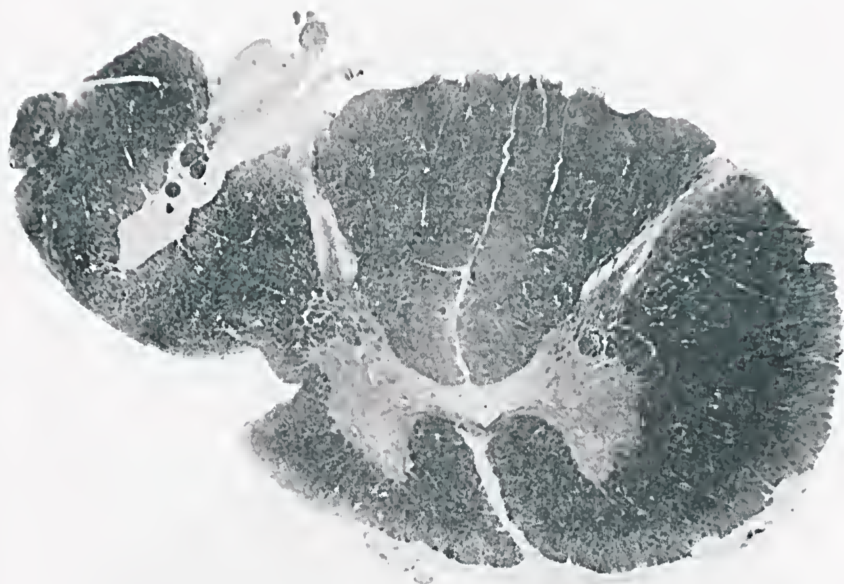


Fig. 34. Caso 8, lâm. 37. Aum. 9x.

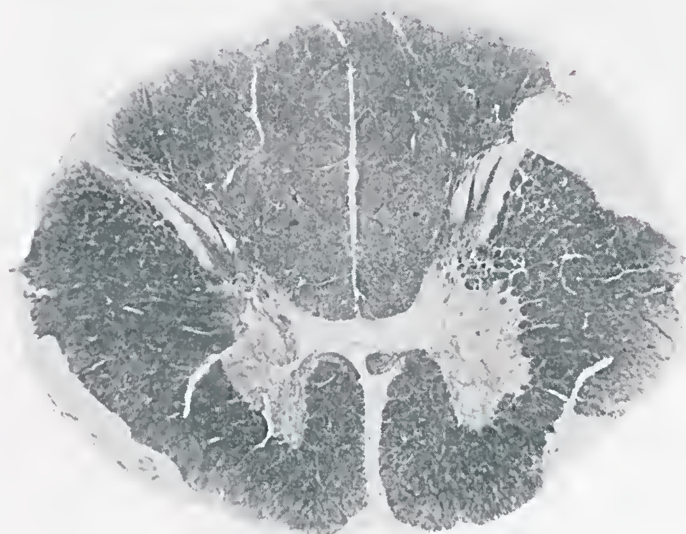


Fig. 35. Caso 8, lâm. 38. Aum. 10x.

CASO 9

L A M	C O L	A L T	
1	E	Ca	Nada digno de nota.
2	E	S	Arquitetura alterada: assimetria que simula artifício de técnica.
3/6	E	S	Arquitetura normal.
7/10	E	L	——— " ——— " ———
11/32	E	T	——— " ——— " ———
33/39	E	C	——— " ——— " ———

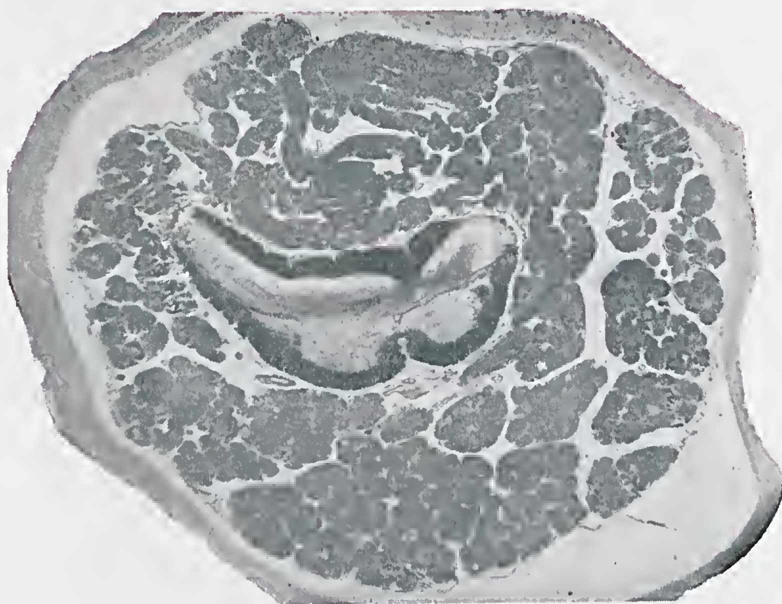


Fig. 36. Caso 9, lâm. 2. Aum. 7,5x.

CASO 10

L A M	C O L	A L T	
1/4	E	Ca	Nada digno de nota.
5/7	E	S	Arquitetura normal.
8/12	E	L	——— " ——— " ———
13/15	E	T	——— " ——— " ———
16	E	T	——— " ——— alterada (ausência de uma espícula lateral).
16	N	T	Ausência de um dos núcleos intermédio-laterais.
17	E	T	Arquitetura alterada (espículas laterais praticamente ausentes).
17	N	T	Ausência dos núcleos intermédio-laterais.
18	E	T	Arquitetura alterada (ausência de espícula lateral).
18	N	T	Ausência de um dos núcleos intermédio-laterais.
19	E	T	Arquitetura alterada (ausência de espículas laterais).
19	N	T	Ausência de núcleos intermédio-laterais.
20	E	T	Arquitetura alterada (ausência de espículas laterais).
20	N	T	Ausência de núcleos intermédio-laterais.
21	E	T	Arquitetura alterada (ausência de uma espícula lateral).
21	N	T	Ausência de núcleos intermédio-laterais.
22	E	T	Arquitetura discretamente alterada.
22	N	T	Núcleos intermédio-laterais presentes.
23	E	T	Estrutura quase normal.
23	N	T	Núcleos intermédio-laterais presentes.
24	E	T	Ausência de uma espícula lateral.
24	N	T	Núcleos intermédio-laterais nos cornos posteriores.
25	E	T	Arquitetura quase normal.
25	N	T	Núcleos intermédio-laterais presentes.
26	E	T	Arquitetura quase normal.
26	N	T	Um dos núcleos intermédio-laterais rarefeito.
27	E	T	Arquitetura quase normal.
27	N	T	Um dos núcleos intermédio-laterais rarefeito.
28	N	T	Núcleos intermédio-laterais presentes.
29	E	T	Arquitetura normal.
29	N	T	Núcleos intermédio-laterais presentes.
30	E	T	Arquitetura normal.
30	N	T	Um dos núcleos intermédio-laterais rarefeito.
31	E	T	Arquitetura normal.
31	N	T	Um dos núcleos intermédio-laterais rarefeito.
32	E	T	Arquitetura normal.
32	N	T	Lâminas descoradas.
33	E	T	Arquitetura normal.
33	N	T	Núcleos intermédio-laterais presentes.
34	E	C	Arquitetura normal.
34	N	C	Nada digno de nota.
35/37	E	C	Arquitetura normal.
38	E	C	——— " ——— alterada: um corno anterior bem maior, do que o outro e de forma anômala (espécie de excrescência lateral).
38	N	C	Células do corno anterior do lado anômalo n.o mostram sinais de estiramento.
39	E	C	Arquitetura profundamente alterada.
40	E	C	——— " ——— normal.
41	E	C	——— " ——— alterada.



Fig. 37. Caso 10, lâm. 17. Aum. 15x.

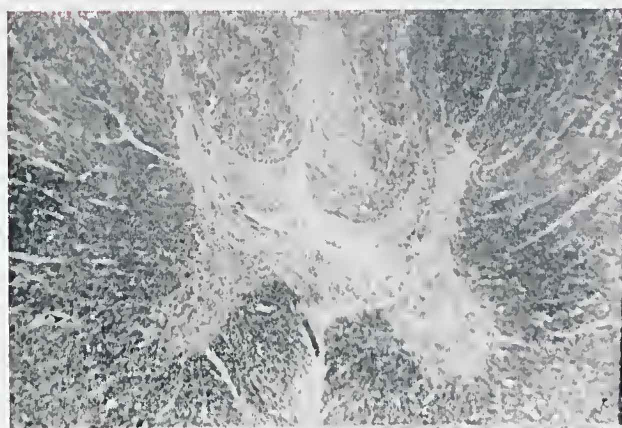
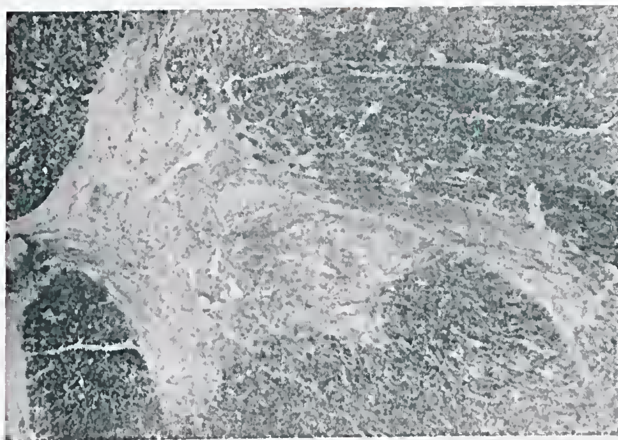


Fig. 38. Caso 10, lâm. 24. Aum. 15x.



— A —



— B —

Fig. 39. Caso 10, lâm. 38. Aum. 15x.

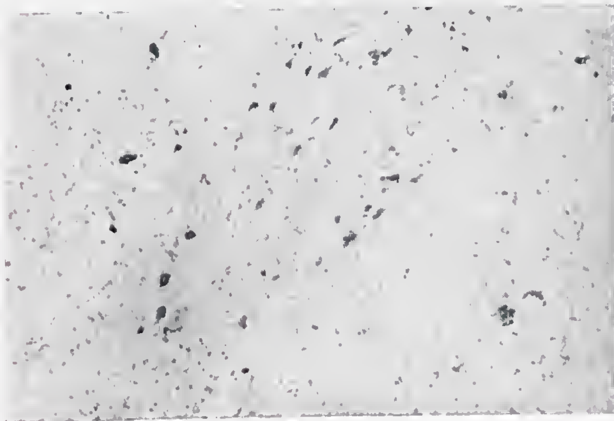


Fig. 40. Caso 10, lâm. 38. Aum. 40x.

CASO 11

L A M	C O L	A L T	
1/3	E	Ca	Nada digno de nota.
4/9	E	S	Arquitetura normal.
10/14	E	L	——— " ——— " ——
15/37	E	T	——— " ——— " ——
38/41	E	C	——— " ——— " ——
42/43	E	C	——— " ——— alterada
44/46	E	C	——— " ——— normal.
47	E	C	——— " ——— alterada

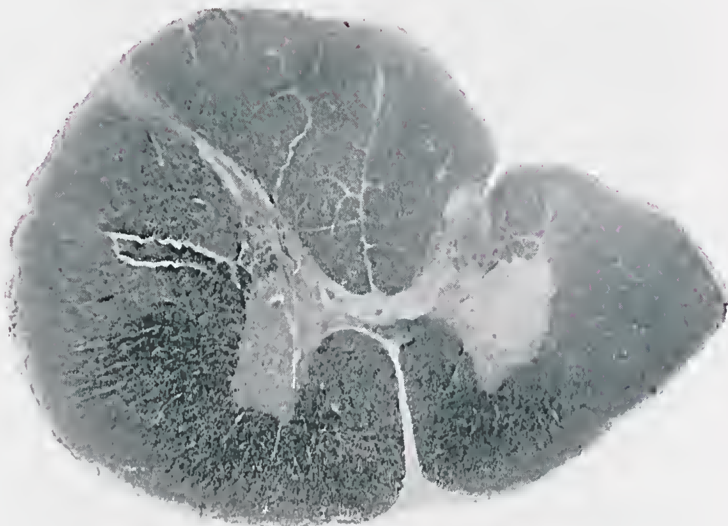


Fig. 41. Caso 11, lâm. 47. Aum. 10x.

CASO 12

L A M	C O L	A L T	
1/5	E	Ca	Arquitetura normal.
6/9	E	S	——— " ——— " ———
10/14	E	L	——— " ——— " ———
15/35	E	T	——— " ——— " ———
36/39	E	C	——— " ——— " ———
40	E	C	——— " ——— alterada.
41	E	C	——— " ——— quase normal.
42	E	C	——— " ——— alterada
43	E	C	——— " ——— quase normal.

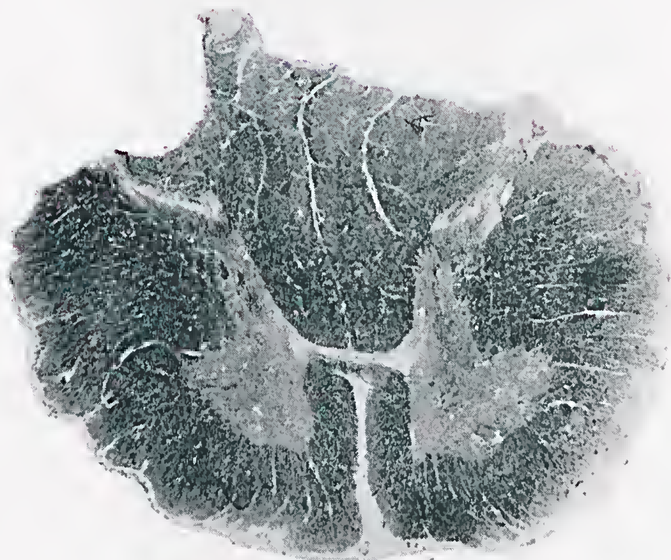


Fig. 42. Caso 12, lâm. 40. Aum. 8,5x.

CASO 13

L A M	C O L	A L T	
1/5	E	Ca	Nada digno de nota.
6	E	S	Arquitetura profundamente alterada (tipo diastematomielia).
6	N	S	Arquitetura profundamente alterada (dois canais centrais).
7	E	S	Arquitetura profundamente alterada (tipo diastematomielia).
7	N	S	Arquitetura profundamente alterada (dois canais centrais).
8	E	S	Arquitetura alterada.
9	E	S	Arquitetura profundamente alterada (tipo diastematomielia).
10	E	L	Arquitetura profundamente alterada (tipo diastematomielia).
11/16	E	L	Arquitetura normal.
17/18	E	T	——— " ——— " ——
19	E	T	——— " ——— discretamente alterada (uma espícula menor do que a outra).
20	E	T	Arquitetura discretamente alterada (uma espícula bem menor do que a outra).
20	N	T	Rarefação de um núcleo intermédio-lateral.
21	E	T	Arquitetura discretamente alterada (igual a 19).
21	N	T	Rarefação de um núcleo intermédio-lateral.
22	E	T	Arquitetura discretamente alterada.
23	E	T	Arquitetura discretamente alterada (igual a 20).
24	E	T	Arquitetura quase normal.
25	E	T	Arquitetura discretamente alterada (igual a 20).
25	N	T	Um núcleo intermédio lateral rarefeito.
26	E	T	Arquitetura quase normal.
27	E	T	Um núcleo intermédio-lateral rarefeito.
27	N	T	Ambos os núcleos intermédio-laterais muito rarefeitos.
28	E	T	Arquitetura quase normal.
29/32	E	T	Arquitetura normal.
33	E	T	Arquitetura alterada (disposição radiada das fibras da substância branca).
34/36	E	T	Arquitetura normal.
37	E	T	——— " ——— alterada (igual a 33).
38/39	E	T	——— " ——— nomal.
40	E	T	——— " ——— discretamente alterada.
41	E	C	——— " ——— alterada (igual a 33).
42	E	C	——— " ——— normal.
43	E	C	——— " ——— alterada (igual a 33).
44/45	E	C	——— " ——— normal.
46	E	C	——— " ——— alterada (igual a 33).



Fig. 43. Caso 13, lâm. 7. Aum. 8x.



Fig. 44. Caso 13, lâm. 6. Aum. 40x.

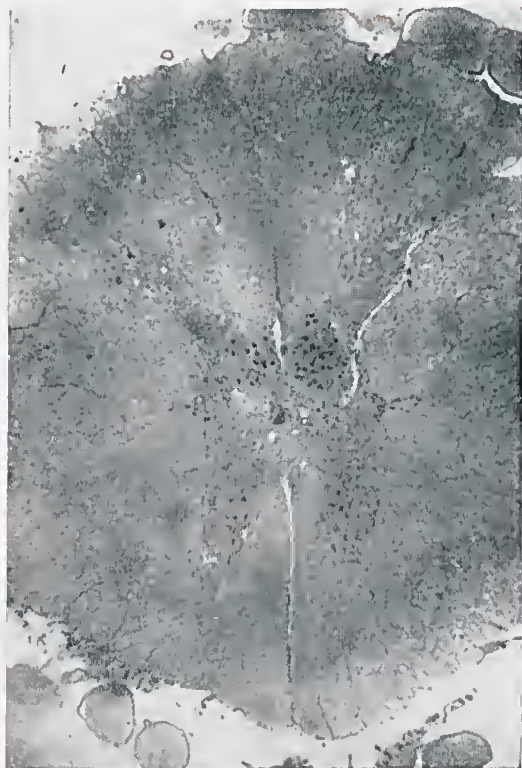


Fig. 45. Caso 13, lâm. 21. Aum. 10x.

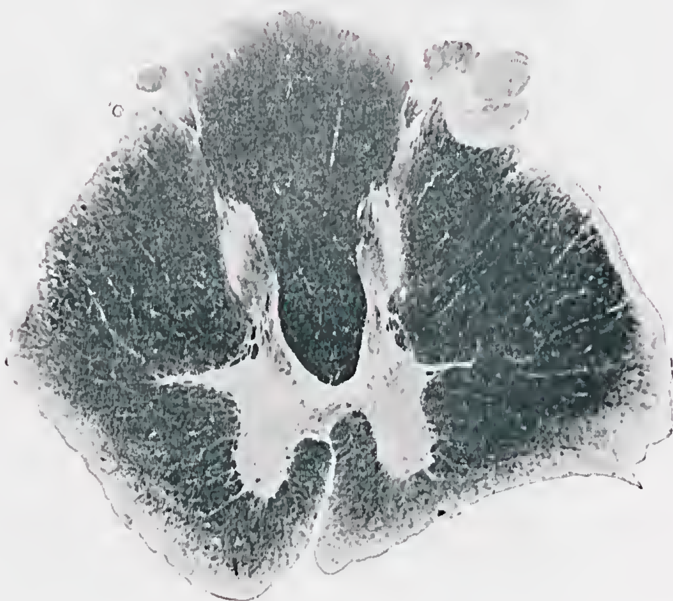


Fig. 46. Caso 13, lâm. 40. Aum. 10x.





Fig. 47. Caso 13, lâms. 41 e 43. Aum. 25x.

CASO 14

L A M	C O L	A L T	
1	E	Ca	Nada digno de nota.
2/4	E	S	Arquitetura normal.
5/8	E	L	" "
9/12	E	T	" "
13	E	T	" alterada (ausência de espículas laterais) discretamente.
13	N	T	Núcleos intermédio-laterais nos cornos posteriores.
14/21	E	T	Arquitetura profundamente alterada (pode simular artifício de técnica).
22/24	E	T	Arquitetura alterada (pode simular artifício de técnica).
25/26	E	T	Arquitetura profundamente alterada (*não pode simular* artifício de técnica).
27/28	E	T-C	Arquitetura quase normal.
29/30	E	C	" normal.
31/32	E	C	" alterada (pode simular artifício de técnica) Grande aumento de tamanho.
33	E	C	Arquitetura quase normal.
34	E	C	" normal.

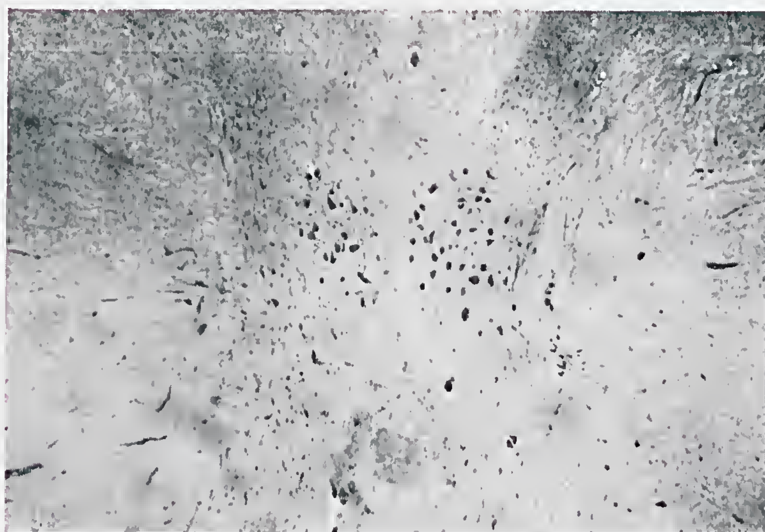


Fig. 48. Caso 14, lâm. 13. Aum. 20x.



Fig. 49. Caso 14, lâm. 14. Aum. 10x.

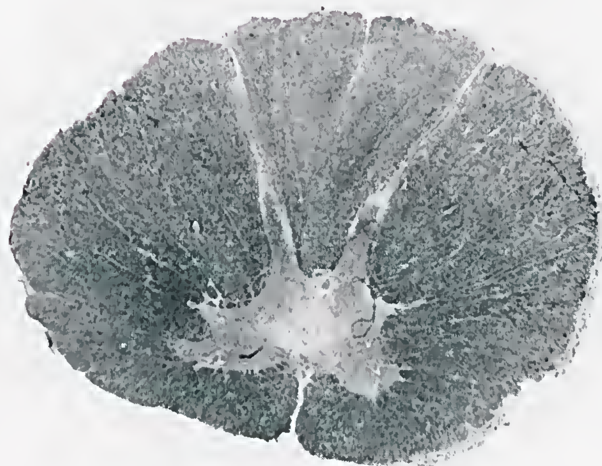


Fig. 50. Caso 14, lâm. 23. Aum. 10x.

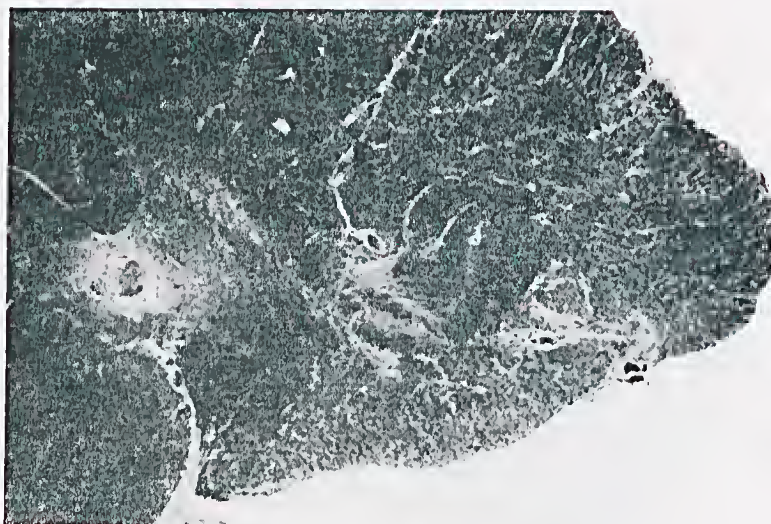


Fig. 51. Caso 14, lâm. 26. Aum. 10x.

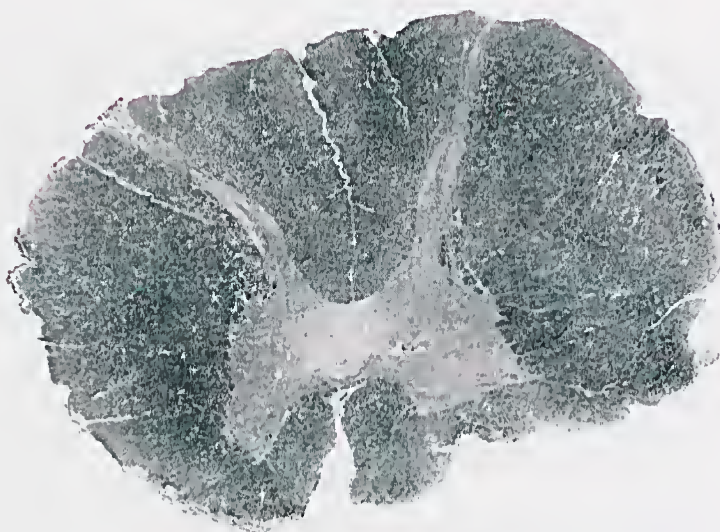


Fig. 52. Caso 14, lâm. 33. Aum. 9x.



Fig. 53. Caso 14, lâm. 32. Aum. 10x.

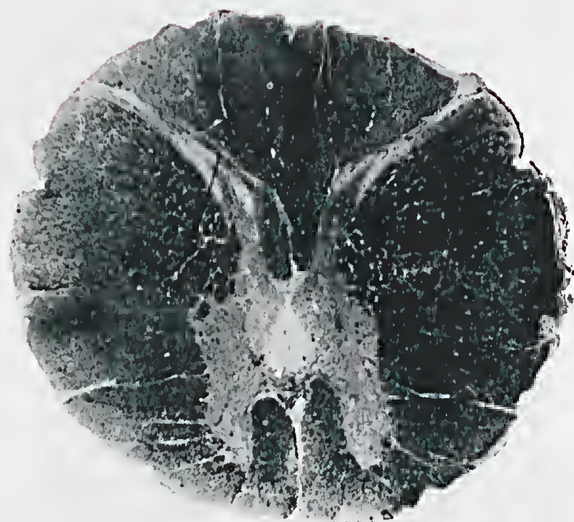


Fig. 54. Caso 14, lâm. 34. Aum. 9,5x.

CASO 15

L A M	C O L	A L T	
1/3	E	Ca	Nada digno de nota.
4/6	E	S	Arquitetura normal.
7/11	E	L	——— " ——— " ———
12/33	E	T	——— " ——— " ———
34/36	E	C	——— " ——— " ———
37/43	E	C	——— " ——— profundamente alterada.

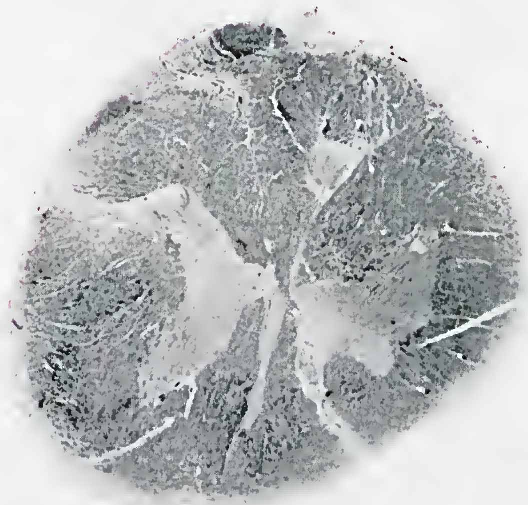


Fig. 55. Caso 15, lâm. 39. Aum. 8x.

CASO 16

L A M	C O L	A L T	
2/5	E	Ca	Nada digno de nota.
6/8	E	S	Arquitetura normal.
9/12	E	L	——— " ——— " ——
14/16	N	T	Uma espícula lat. no corno post.; outra de tamanho reduzido.
17/23	E	T	Arquitetura profundamente alterada.
24/25	E	T	——— " ——— alterada.
26	E	T	——— " ——— profundamente alterada.
27/34	E	T	——— " ——— normal.
35/43	E	C	——— " ——— normal.

Observação: em todas as alturas há denegeração do feixe piramidal cruzado de um lado.

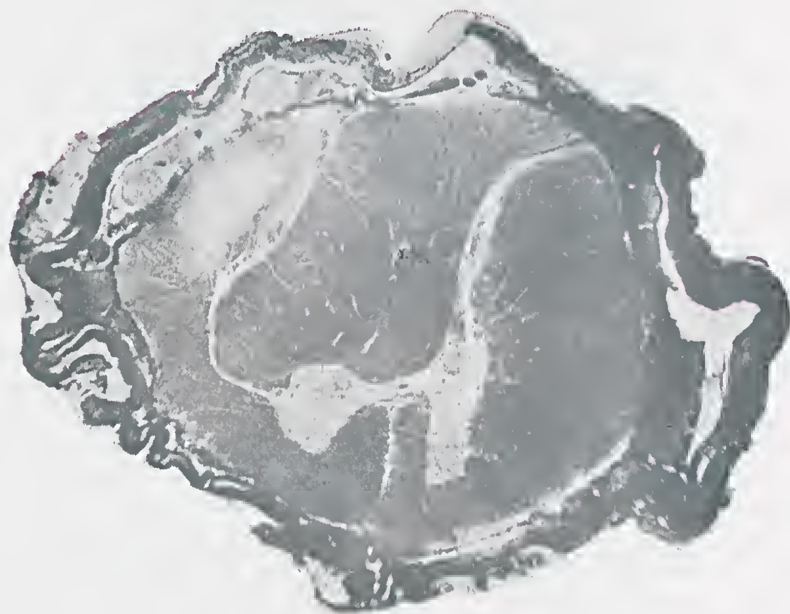


Fig. 56. Caso 16, lâm. 18-A. Aum. 10x.

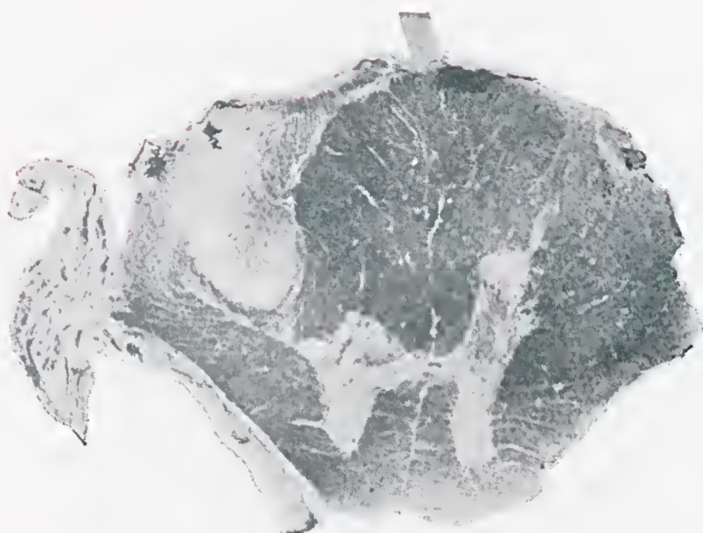


Fig. 57. Caso 16, lâm. 18-B. Aum. 10x.



Fig. 58. Caso 16, lâm. 19. Aum. 10x.

CASO 17

L A M	C O L	A L T	
32/33	E	S	Arquitetura normal.
30/31	E	L	——— " ——— " ———
28/29	E	L	——— " ——— profundamente alterada.
26	E	T	——— " ——— discretamente alterada.
25	E	T	——— " ——— praticamente normal.
24	E	T	——— " ——— alterada (núcleo anômalo na zona intermediária dos cornos de um lado).
21/23	E	T	Arquitetura praticamente normal.
17/20	E	T	——— " ——— discretamente alterada.
14/15	E	T	——— " ——— " ——— " ———
11/12	E	T	——— " ——— " ——— " ———
8/10	E	T	——— " ——— praticamente normal.
1/7	E	C	——— " ——— normal.



Fig. 59. Caso 17, lâm. 28. Aum. 7x.

CASO 18

L A M	C O L	A L T	
1/6	E	Ca	Nada digno de nota.
7/9	E	S	Arquitetura praticamente normal: apenas discreta assimetria (que não pode ser artifício de técnica) a que corresponde maior população neuronal de um dos lados.
10/14	E	L	Arquitetura normal.
15/16	E	T	——— " ——— " ———
17/28	E	T	Espículas laterais apenas esboçadas.
17/28	N	T	Rarefação celular dos núcleos intermédio-laterais.
29/32	E	T	Arquitetura normal.
33	E	C	Arquitetura normal.
34	E	C	——— " ——— praticamente normal.
35/36	E	C	——— " ——— alterada.
37	E	C	——— " ——— profundamente alterada.
38/40	E	C	——— " ——— praticamente normal.

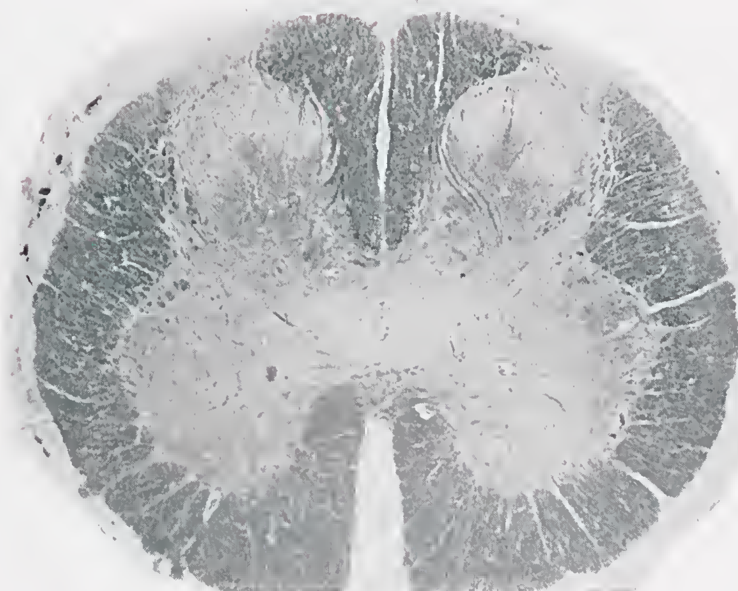


Fig. 60. Caso 18, lâm. 8. Aum. 18x.



Fig. 61. Caso 18, lâm. 9. Aum. 10x.



Fig. 62. Caso 18, lâm. 36-B. Aum. 9x.

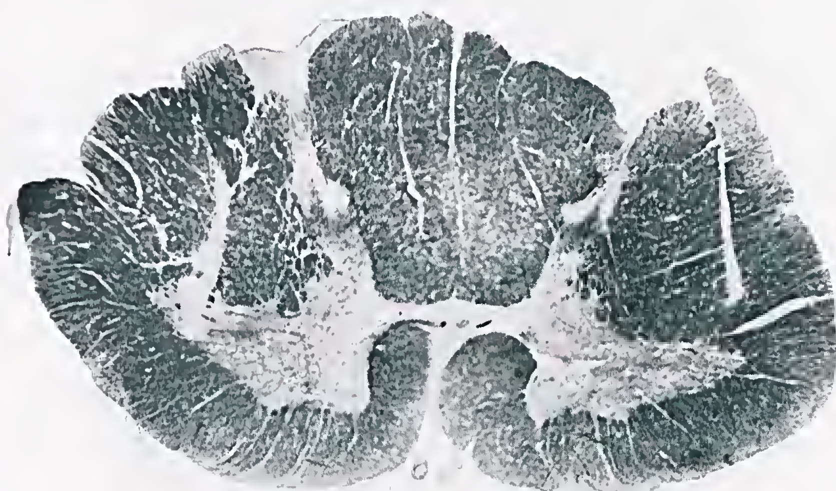


Fig. 63. Caso 18, lâm. 37. Aum. 7,5x.

CASO 19

L A M	C O L	A L T	
1/3	E	Ca	Nada digno de nota.
4/7	E	S	Arquitetura normal.
8/12	E	L	——— " ——— " ———
13/16	E	T	——— " ——— " ———
17	E	T	Uma espícula lateral menor que a outra.
17	N	T	Um dos núcleos intermédio-laterais rarefeito.
18	E	T	Igual a 17.
18	N	T	Igual a 17.
19	E	T	Igual a 17.
19	N	T	Igual a 17.
20	E	T	Espículas laterais apenas esboçadas.
20	N	T	Rarefação dos núcleos intermédio-laterais.
21	E	T	Igual a 17.
21	N	T	Cito-arquitetura aparentemente normal.
22	E	T	Igual a 17.
22	N	T	Igual a 17.
23	E	T	Igual a 17. Uma arteríola esclerosada ocupa grande parte de uma espícula lateral.
23	N	T	Igual a 17. Uma arteríola esclerosada ocupa grande parte de um núcleo intermédio-lateral que está muito rarefeito.
24	E	T	Arquitetura normal. Arteríolas esclerosadas.
24	N	T	Igual a 17.
25	E	T	Arquitetura normal.
25	N	T	Igual a 17.
26	E	T	Arquitetura praticamente normal. Três arteríolas esclerosadas ocupam a comissura cinzenta.
26	N	T	Ambos os núcleos intermédio-laterais presentes e aparentemente normais.
27	E	T	Arquitetura normal.
27	N	T	Ausência de células de um corno lateral, ocupado por uma arteríola arciforme esclerosada.
28	E	T	Arquitetura normal.
28	N	T	Ambos os núcleos intermédio-laterais presentes.
29	E	T	Arquitetura normal.
29	N	T	Ambos os núcleos intermédio-laterais rarefeitos, um mais acentuadamente.
30	E	T	Arquitetura normal.
30	N	T	Um dos núcleos intermédio-laterais rarefeito.
31	E	T	Arquitetura normal.
31	N	T	Núcleos intermédio-laterais aparentemente normais.
32/38	E	C	Arquitetura normal.

Observação: há arteriolosclerose em todas as alturas.





Fig. 64. Caso 19, lâm. 26. Aum. 25x.



Fig. 65. Caso 19, lâm. 27. Aum. 20x.

CASO 20

LAM	COL	ALT	
1/3	E	S	Arquitetura alterada: uma hemi-medula menor do que a outra; do lado menor, há considerável redução da subst. cinzenta dos cornos anterior e posterior.
4/8	E	L	Arquitetura normal.
9/12	E	T	——— " ——— " ——
13	E	T	——— " ——— quase normal (uma espícula lateral quase desaparecida).
14	E	T	Arquitetura normal. Uma espícula lateral ocupada por duas arteríolas esclerosadas.
15	E	T	Arquitetura normal. Uma espícula lateral ocupada por duas arteríolas esclerosadas.
16	E	T	Arquitetura alterada (ausência de uma espícula lateral) discretamente.
17/18	E	T	Arquitetura normal.
19	E	T	Arquitetura quase normal (uma espícula lateral apenas esboçada). Arteríola que se dirige para ela esclerosada.
20	E	T	Arquitetura normal.
22	E	T	Arquitetura quase normal (uma espícula lateral bem menor do que a outra. A arteríola que se dirige para ela, esclerosada).
23	E	T	Arquitetura normal.
24	E	T	Arquitetura alterada discretamente (ausência de espícula lateral). Fibras de substância branca de direção horizontal.
25	E	T	Arquitetura alterada discretamente (ausência de uma espícula lateral). Fibras de substância branca irradiam-se horizontalmente do corno anterior dêsse mesmo lado.
26	E	T	Arquitetura normal. Uma espícula lateral ocupada por arteríolas esclerosadas.
27/28	E	T	Arquitetura normal.
29	E	T-C	——— " ——— " —— Esclerosada a arteríola que se dirige para uma espícula lateral, ocupada por arteríolas com o mesmo processo degenerativo.
30	E	C	Arquitetura normal.
31/32	E	C	——— " —— alterada.
33/35	E	C	——— " —— normal.
36	E	C	——— " —— alterada.

Observação: há arteriosclerose em todas as alturas.



Fig. 66. Caso 20, lâm. 2. Aum. 12x.

CASO 21

L A M	C O L	A L T	
1	E	S	Arquitetura normal.
1	N	S	Rarefação celular dos núcleos em franja.
2	E	S	Arquitetura normal. Arterioloselerose.
2	N	S	Rarefação celular dos núcleos em franja. Em cada um deles aparece uma arterícla esclerosada.
3	E	S	Arquitetura normal.
4/5	E	L	——— " ——— " ——
6	E	L-T	——— " ——— " ——
7/8	E	T	——— " ——— " ——
7/8	N	T	Um dos núcleos intermédio-laterais rarefeito.
9	E	T	Arquitetura normal.
9	N	T	Um dos núcleos intermédio-laterais ausentes é ocupado por uma arteríola esclerosada.
10	E	T	Arquitetura normal.
10	N	T	Um dos núcleos intermédio-laterais rarefeito.
11	E	T	Arquitetura normal.
11	N	T	Núcleos intermédio-laterais normais.
12	E	T	Arquitetura normal.
12	N	T	Núcleos intermédio-laterais (igualmente) pouco densos.
13/14	E	T	Arquitetura normal.
13/14	N	T	Um dos núcleos intermédio-laterais rarefeito (praticamente ausente).
15	E	T	Arquitetura normal.
15	N	T	Um dos núcleos intermédio-laterais ausente.
16	E	T	Arquitetura normal.
16	N	T	Um dos núcleos intermédio-laterais rarefeito.
17	E	T	Arquitetura normal.
17	N	T	Núcleos intermédio-laterais igualmente densos (normais).

Observação — Há arterioloselerose em todas as alturas, sempre mais intensa na comissura cinzenta, onde chega a formar-se estado lacunar.



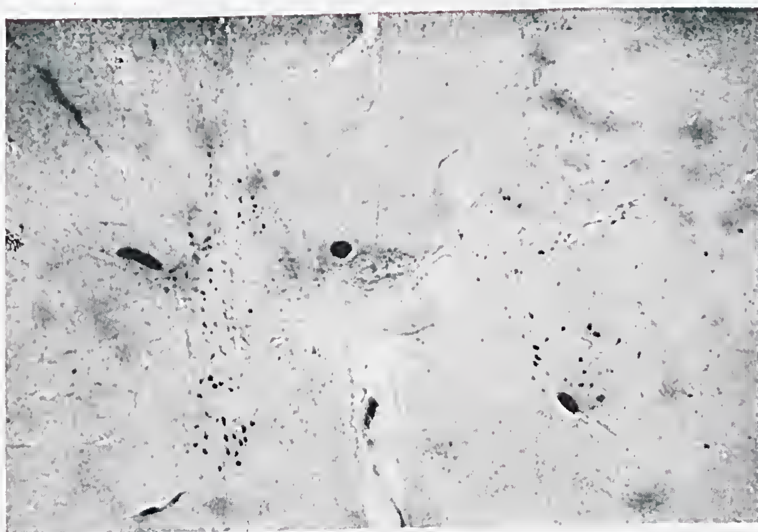


Fig. 67. Caso 21, lâm. 9. Aum. 20x.

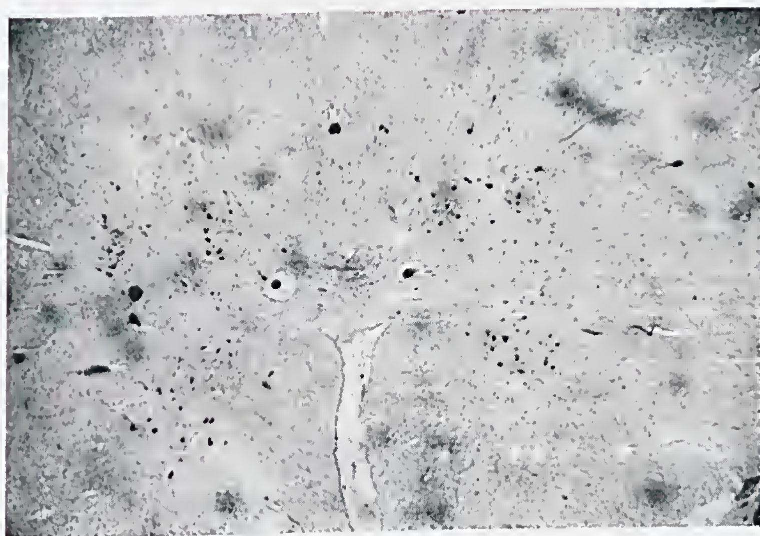


Fig. 68. Caso 21, lâm. 15. Aum. 20x.

RESUMO DA CASUÍSTICA

Para efeito deste resumo, foram estabelecidos alguns conceitos: a) cataloguei na tabela 1 como disgenéticas as alturas medulares que classificara como de "arquitetura alterada" ou de "arquitetura profundamente alterada", apenas, a fim de dar à argumentação baseada na mesma u'a margem de segurança bastante ampla; a altura torácica do caso 10 aí aparece, apesar de ter alterações arquitetônicas classificadas em cada segmento por "arquitetura discretamente alterada", porque os cortes corados pelo método de Nissl revelaram *ausência* dos núcleos intermédio-laterais em tres segmentos sucessivos; b) no caso 1 não foi possível a definição exata da altura da medula nos segmentos 3 a 9, pela morfologia; mas, pela seriação dos cortes, as alterações de desenvolvimento são muito provavelmente sagradas e lombares, e, como tais, foram tabeladas;

c) não considerei a degeneração do feixe piramidal cruzado como lesão medular adquirida porque nos casos estudados não era lesão primária do órgão (como o seria se se tratasse de mielose funicular, por exemplo) e porque esse feixe não tem relação com as estruturas que interessavam (isso não seria admissível se cuidasse da cito-arquitetura dos cornos anteriores, p. ex.); convém consignar, também, que essa lesão não causa deformidades na medula que se possam confundir com alterações de desenvolvimento.

1. Dos 21 casos estudados, 18 apresentavam lesões disgenéticas; dois, lesões adquiridas; um, lesões de ambos os tipos.

2. Os dois casos somente com lesões adquiridas apresentavam lesões dos centros neuro-vegetativos (substância cinzenta peri-ependimária) e dos seus núcleos motores ortossimpáticos (núcleos intermédio-laterais) e parassimpáticos ("em franja"). Em ambos encontrei arteriolosclerose, à qual atribui as lesões referidas, que no caso 19 atingiam toda a altura torácica e no caso 21, as alturas sagrada e torácica (não sei da cervical porque foi neste caso que faltou essa altura no material estudado).

CASO	ALTURA			
	S	L	T	C
1	x	x		
2			x	x
3	x	x	x	x
4		x	x	x
5			x	x
6				x
7				x
8		x	x	
9	x			
10			x	x
11				x
12				x
13	x	x	x	x
14			x	x
15				x
16			x	
17		x	x	
18				x
20	x			x

TABELA 1

Alturas das disgenesias medulares.

4. As alterações de desenvolvimento atingiam (v. tabela 1):

a) em 8 casos, uma só altura (casos 6,7,9,11,12,15,16,18), cervical em 6 casos (6,7,11,12,15,18), torácica em um (16) e sagrada em um (9);

b) em 7 casos, duas alturas seguidas (casos 1,2,5,8,10,14,17), sendo S-L em um caso (1), L-T em dois (8,17) e T-C em quatro (2, 5,10,14);
c) em 1 caso, tres alturas seguidas (caso 4), que eram L-T-C;
d) em 2 casos, todas as alturas (3,13);
e) em 1 caso, duas alturas separadas (20).

5. Nas 19 medulas disgenéticas, as mal-formações apareceram:

a) 14 vezes na altura cervical;
b) 10 vezes na altura torácica;
c) 6 vezes na altura lombar;
d) 5 vezes na altura sagrada.

DISCUSSÃO

1. Das 21 medulas espinhais de casos de megacólon que foram objeto de estudo, 18 apresentavam lesões disgenéticas, 2 apresentavam lesões adquiridas e uma, lesões mistas.

Tendo examinado apenas quatro dos aproximadamente 300 cortes possíveis em cada segmento clivado, tais resultados não são absolutamente seguros. Não deixam, entretanto, de ser muito provavelmente certos, pois, ainda que o número de lâminas examinadas represente apenas pequena fração das que se poderiam obter em cortes seriados, constituem a meu ver, número significativo (em média 160 de cada medula), mesmo porque as 4 lâminas examinadas não eram necessariamente as 4 primeiras de cada bloco, mas colhidas ao acaso de um número de cortes nunca inferior a 40. Algumas discrepâncias entre arquitetura e população neuronal, como se observam no caso 19, explicam-se por este motivo.

Apresenta-se, assim, uma primeira verificação: *as medulas são disgenéticas na grande maioria dos casos de megacólon, mas muito provavelmente não na sua totalidade.*

2. A medula é órgão extremamente complexo e o dizer-se simplesmente que é mal-formada constitui-se em afirmação quase aleatória, pois nada esclarece quanto ao mecanismo patogênico de nenhuma doença, o megacólon inclusive.

Entretanto, do exame dos meus casos, me parece possível chegar-se à estrutura medular que é a peça desse mecanismo. Primeiramente vejamos os casos apenas com lesões adquiridas:

O caso 19 apresentava acentuada arterioloesclerose localizada predominantemente nas bases dos cornos anteriores e posteriores e na substância cinzenta peri-ependimária (fig. 64), zonas que constituem os centros neuro-vegetativos medulares; às vezes, a relação entre lesão vascular e rarefação celular era muito evidente (fig. 65); além disso, neste caso, as lesões ocupavam apenasmente a altura torácica, delas estando livres as alturas sagrada, lombar, e

cervical, e atingiam a coluna intermédio-lateral, portanto, havia especificamente comprometimento das colunas motoras ortossimpáticas, com rarefação, ora de uma, ora de outra, ora de ambas.

O caso 21 apresentava arteriolosclerose generalizada, rarefação celular dos núcleos em franja (parassimpático caudal) e rarefação de um ou de ambos os núcleos intermédio-laterais (ortossimpático) em todos os segmentos que normalmente ocupam, portanto, lesão dos dois setores neuro-vegetativos.

Tais lesões, na falta de alterações congênitas, revelam atrofia dos núcleos motores simpáticos (lesões secundárias).

Acho que elas permitem supor que as estruturas medulares comprometidas no mecanismo do megacólon adquirido são as neuro-vegetativas, o que parece lógico, óbvio mesmo, uma vez que o liame entre medula e intestinos é representado pelos neurônios periféricos simpáticos.

Se isto é válido para as lesões adquiridas, o deve de ser para as disgenéticas e, então, podemos concluir que, nas medulas mal-formadas, com muita probabilidade, são as alterações de desenvolvimento das estruturas neuro-vegetativas que provocam as enteromegalias. Vejamos o que constatei:

2.1 Nos casos como os de números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 13, 14, 16, 17 e 18, com lesões disgenéticas imponentes era muito difícil de avaliar o estado do simpático medular ao exame microscópico das alturas afetadas por esse tipo de lesões; mas, fora delas, em segmentos em que havia apenas discretas alterações arquitetônicas (rotuladas como "arquitetura discretamente alterada" ou "arquitetura quase normal") foi possível fazer um estudo cuidadoso:

No caso 1, nos segmentos 16 a 28 (T) e 25 (C) as espículas laterais (colunas celulares intermédio-laterais) faltavam ou estavam pouco desenvolvidas de um ou de ambos os lados.

No caso 2, nos segmentos toráeicos 18 a 20 e 23 a 26, as espículas laterais eram apenas esboçadas ou faltavam de um lado ou praticamente faltavam de ambos.

No caso 3, nos segmentos toráeicos 5 a 12 e 16 a 22, uma espícula lateral estava apenas esboçada.

No caso 4, do segmento 17 ao 32, todos torácicos, havia inúmeras alterações do setor simpático medular, tais como ausência ou tamanho reduzido de uma espícula lateral, ambas apenas esboçadas, ambas em situação anômala nos cornos posteriores; sempre que as espículas eram menores ou apenas esboçadas, a população neuronal, avaliada pelo método de Nissl, estava rarefeita.

No caso 5, lesões semelhantes apareceram nos segmentos torácicos de 7 a 20 (rarefação celular, localização anômala etc).

No caso 6, havia ausência de uma espícula lateral na metade cefálica da medula torácica (segmentos 24 e 30).

No caso 8, lesões dos núcleos intermédio-laterais foram constatadas nos segmentos torácicos 13, 16 a 26 e 28.

No caso 13, as lesões disgenéticas, que nas alturas sagrada e lombar eram muito complexas, na altura torácica, entre os segmentos 19 e 27, eram de molde

a permitir o estudo da coluna celular ortossimpática, a qual apresentava essas mesmas alterações arquitetônicas das espículas laterais com correspondente rarefação ou praticamente ausência dos núcleos intermédio-laterais.

No caso 14, havia alterações de igual natureza da mesma coluna no segmento 13.

No caso 16, nas alturas torácicas de 14 a 16, uma espícula lateral estava no corno posterior e a outra era de tamanho reduzido.

No caso 17, havia um núcleo anômalo na zona intermediária (base) dos cornos de um lado, portanto, em plena zona simpática, no segmento torácico 24.

No caso 18, as espículas laterais eram pouco desenvolvidas nos segmentos torácicos de 17 a 28, ao que correspondia rarefação celular dos núcleos intermédio-laterais.

Na ausência de lesões adquiridas, essas lesões descritas revelam aplasia, hipoplasia ou displasia (revelada por localização anômala) *dos núcleos motores simpáticos* (lesões primárias).

2.2 Em casos com disgenesias arquiteturais discretas, como os de números 9, 10 e 20, encontrei lesões igualmente significativas, pois atingiam, no primeiro o setor parassimpático caudal; no segundo, especificamente a coluna ortossimpática, havendo em diversos segmentos até ausência das espículas laterais (e dos núcleos intermédio-laterais), e no terceiro, ambos os setores.

Portanto, quando as lesões disgenéticas medulares permitiram o estudo dos centros neuro-vegetativos, constatei que eles estavam afetados, confirmando a suposição baseada no estudo das medulas com lesões somente adquiridas (este foi o caminho seguido na pesquisa).

Perante essa constatação, acho válido concluir que, se nas alturas atingidas por disgenesias discretas há lesões dos centros neurovegetativos medulares, nas alturas que apresentam disgenesias mais acentuadas ("arquitetura alterada" e "arquitetura profundamente alterada") as lesões de tais centros devem de ser mais graves.

3. Concluindo-se que os centros neuro-vegetativos medulares podem estar implicados no mecanismo patogênico das enteromegalias, se conclui também que o estudo da medula é insuficiente para se avaliar a participação de todos os centros nervosos autônomos nesse mecanismo.

Com efeito, conforme se vê no esquema da fig. 69, o sistema nervoso autônomo tem centros orto e parassimpáticos no eixo cérebro-espinhal. Os primeiros estão principalmente na medula torácica, pois vão de C_8 a L_2, e os segundos, no tronco cerebral e na medula sagrada.

Um estudo de tais centros tanto quanto possível completo, exige o do tronco cerebral (onde se localizam: o núcleo cárdio-pneumo-entérico ou motor dorsal do vago — X par; o núcleo salivatório inferior — IX par; o núcleo salivatório superior — VII par; o núcleo lácrimo-muco-nasal — VII par; o núcleo ambíguo, faríngeo ou motor ventral do vago — IX e X pares; o núcleo do feixe solitário ou gustativo — VII bis, IX e X pares; todos do tubo digestivo), em particular, para o que nos interessa, o do bulbo, onde se localiza o núcleo

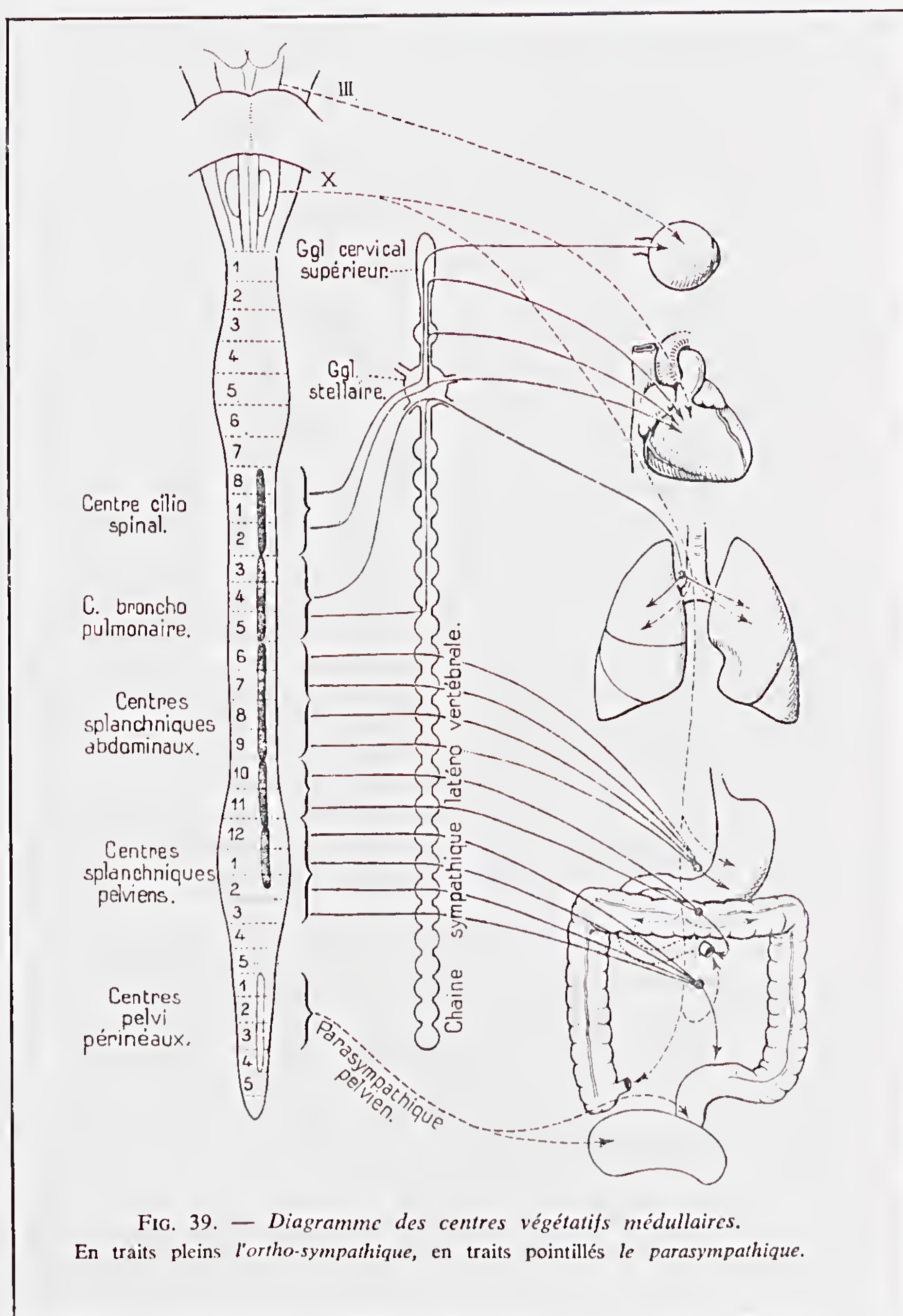


FIG. 39. — *Diagramme des centres végétatifs médullaires.*
En traits pleins *l'ortho-sympathique*, en traits pointillés *le parasympathique*.

Fig. 69. Diagrama dos centros vegetativos medulares (reproduzido de DELMAS, A. — *Voies et centres nerveux*, Masson & Cie. Paris, 9.ª ed., 1970).

cárdio-pneumo-entérico, que inerva de fibras parassimpáticas o intestino, até o 1/3 superior do colon descendente.

O meu material sugere algo a respeito.

Considerando que disgenesias isoladas apareceram seis vezes na medula cervical; que nas outras alturas, apenas uma vez na sagrada e uma na torácica; que a disgenesia cervical não pode ser invocada na patologia dos neurônios motores periféricos simpáticos (apenas C^8 contém algumas eélulas em continuação com as espículas laterais torácicas); que as disgenesias de mais de uma altura eram sempre vizinhas, exceto em um caso; que nesses seis casos não havia disgenesia (arquitetura alterada ou profundamente alterada) na altura vizinha mais caudal; tudo sugere a probabilidade da altura mais eefálica, isto é, o bulbo, apresentar alterações de desenvolvimento neles.

Convém assinalar a esta altura que HIGGS e cols[7] provocaram em gatos, por meio da lesão eletrolítica do núcleo motor dorsal (bulbar) do vago, acalásia do cárdia.

4. O esquema da fig. 69 mostra que os centros simpáticos motores medulares são divididos em centros cílio-espinhal, broneo-pulmonar, esplâncnico-abdominais e esplancnico-pélvicos (todos ortossimpáticos) e centros pelvi-perineais (parassimpáticos), conforme o seu território de distribuição viseeral.

Conquanto que o riquíssimo sistema de anastomoses das fibras simpáticas tornem tal divisão funeionalmente quase aleatória, interessante teria sido uma comparação entre altura medular lesada e segmento intestinal alterado.

Isso não me foi possível fazer porque não assinalei nas autópsias esse segmento, como não assinalei, na clivagem da medula, a altura exata dos blocos, o que teria sido possível a partir da identificação das raízes.

A não ser assim, provavelmente dados interessantes poderia ter colhido. Por exemplo, no caso n.º 9, em que a lesão atingia apenas a altura sagrada teria sido interessante verificar se a enteromegalia atingia o segmento intestinal entre 1/3 superior do cólon descendente e extremidade caudal do reto.

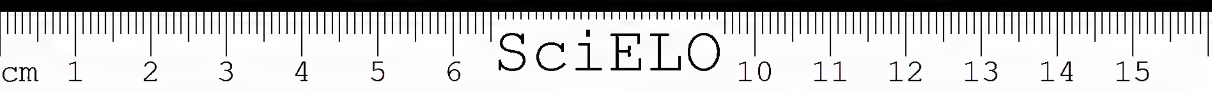
5. Nos 21 casos estudados, verifiquei lesões dos núcleos motores simpáticos em 15 (casos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20 e 21).

Se tais núcleos estão lesados, é lógico que os dois neurônios periféricos o estejam e, possivelmente, provoquem rarefação dos neurônios dos gânglios dos plexos de Meissner e de Auerbaeh.

A ser exata a constatação dos autores que estudaram o plexo mioentérico de Auerbach nas enteromegalias (AMORIM e CORREA NETTO[1], KOEBERLE[12]) *de que há neles rarefação celular, as lesões descritas podem jutifieá-la.*

6. Em vista dos achados, se impõe uma questão: à lesão de qual dos dois setores (orto ou parassimpátieos) do Sistema Nervoso Autônomo pode estar patogenicamente vinculado o megacólon?

Quando se raciocina com a fisionomia do Sistema Nervoso Autônomo, se admite, em geral, que a estimulação dos nervos ortossimpáticos produz no



tubo digestivo, perda do tonus, cessação das contrações rítmicas e constrição dos esfíncteres, enquanto que a estimulação dos nervos parassimpáticos, produz a contração da parede e dilatação dos esfíncteres.

Se assim fosse, uma síndrome parassimpaticopriva produziria dilatação do intestino (por atonia intestinal, acalásia do esfíncter a jusante e acúmulo de bolo fecal) e uma síndrome ortossimpáticopriva produziria efito semelhante, por contração espasmódica de um segmento intestinal, dilatação do segmento a montante e acúmulo de bolo fecal). As síndromes ortossimpáticoprivas, provavelmente explicariam os "megas" de segmentos intestinais que, a jusante, não têm esfíncter. Uma síndrome ortoparassimpáticopriva produziria a aperistalse.

Entretanto, a patologia experimental mostra que a fisiologia do Sistema Nervoso Autônomo é muito complexa e os dados colhidos freqüentemente conflitam entre si, além dos efeitos obtidos serem muitas vezes passageiros e aleatórios.

Tais experimentos encontram inúmeros obstáculos, entre os quais sobressaem: a) a inervação vagossimpática não é igual em todos os mamíferos (por exemplo, o esôfago do gato é controlado pelo núcleo motor dorsal do vago, enquanto que o do cachorro o é pelo núcleo ambíguo); b) as relações dos plexos intramurais com os nervos simpáticos é ainda hoje assunto muito discutido, por mais que se acumulassem trabalhos para resolvê-lo, usando das técnicas mais sofisticadas, cirúrgicas e histoquímicas; conforme disse na Introdução, estamos praticamente no ponto em que Langley nos deixou no início do século; c) o mediador químico é a acetilcolina ao nível da sinapse axoneuronal do primeiro para o segundo neurônios periféricos, tanto ortossimpáticos como parassimpáticos, pois somente ao nível da sinapse neuro-muscular é que a noradrenalina aparece como mediador ortossimpático; d) tanto as fibras parassimpáticas atravessam, sem fazer sinapse, os gânglios ortossimpáticos da cadeia paravertebral, como as fibras ortossimpáticas podem atravessar os gânglios parassimpáticos da cadeia pré-vertebral; e) não se sabe até hoje o papel que as "células intersticiais" dos plexos mioentéricos representam, pois desde Koelliker (1896) até hoje há autores que as consideram apenas células de sustentação, enquanto que outros, desde Cajal (1909), defendem sua natureza neuronal[25]

Tudo isso, e muito mais, não permitem nenhum raciocínio seguro em matéria de patologia humana que necessite de basear-se na fisiopatologia do S. N. Autônomo, muito menos argumentar dentro do esquema teórico dessa oposição orto-parassimpática. Por isso, qualquer argumento que desejasse usar para explicar a patogênese das enteromegalias seria necessariamente simplista, à luz dos conhecimentos atuais, como o são a maioria das explicações tentadas até hoje.

Prefiro apenas assinalar que encontrei lesões medulares de ambos os setores, orto e parassimpático, tanto disgenéticas como adquiridas, em 21 casos de megacólon.

7. Cabe agora perguntar: a) existe megacólon adquirido puro ou sempre há uma lesão disgenética do eixo cérebro espinhal?



Pelo material aqui estudado, parece muito provável que haja megacólon adquirido, isto é, sem disgenesia medular ou troncular. Com efeito, nos casos 19 e 21, as lesões vasculares assestavam-se principalmente nos centros simpáticos medulares e nos seus núcleos motores, o que torna bastante plausível que tais lesões fossem ligadas à doença enteromegálica. Não é preciso como no caso das medulas malformadas só na altura cervical, invocar a possibilidade de outras lesões para correlacionar o megacólon ao simpático encéfalo-espinhal.

Entretanto, não podemos esquecer que o estudo do S. N. Autônomo no S. N. Central torna obrigatório o estudo do tronco cerebral e que, sem este, não podemos afirmar que alguma disgenesia não esteja implicada no processo.

Não posso, pois, responder de maneira cabal à pergunta.

Por enquanto, existe tanto a possibilidade de haver megacólon puro adquirido como a de todos os casos apresentarem obrigatoriamente disgenesias do eixo cérebro-espinhal (não necessariamente medulares).

À vista dos meus achados, em ambas as eventualidades as lesões se localizariam nos centros do S. N. Autônomo, mesmo porque o único liame entre eixo cérebro-espinhal e intestinos são os componentes periféricos desse Sistema (os dois neurônios motores e o neurônio interoceptivo).

b) não havendo megacólon puro adquirido, isto é, no caso do estudo do tronco cerebral e da medula revelar sempre a presença de disgenesia, qual o papel que essa disgenesia representaria na doença enteromegálica?

As mal-formações congênitas constituem apenas o fator endógeno das doenças congênitas. É claro que, por vezes, tal fator é tão intenso que, por si, pode até constituir-se em condição incompatível com a vida. Mas, em regra, não é isso que acontece: a disgenesia é apenas o fator predisponente e para que se manifeste como doença é preciso que incida sobre ela um fator exógeno, que pode ser da mais variada natureza, física, química ou biológica.

As alterações de desenvolvimento que descrevi nas medulas dos casos de megacólon e as que provavelmente existem no tronco cerebral, *representam apenas o substrato constitucional sobre o qual irá incidir um fator exógeno que alterará o equilíbrio adaptativo entre o organismo e disgenesia,* provocando o aparecimento da enteromegalia.

Esse fator exogeno, mesmo entre nós, não é necessariamente a doença de Chagas, inda que esta, devido à sua gravidade possa se constituir em tal fator (nos meus casos não havia indícios de sua participação). No caso 20, nessa ordem de raciocínio, sobre u'a medula mal-formada, se instalou um processo adquirido (arteriolosclerose) que representa o fator exógeno.

8. Quanto à etiologia, *no caso de haver megacólon adquirido puro,* a noxa poderia ser a mais variada possível, desde que capaz de produzir lesões atróficas, degenerativas ou necróticas nos centros simpáticos medulares e tronculares já descritos. *Em tais casos, as enteromegalias seriam síndromes.*

No caso de haver sempre uma disgenesia medular ou troncular, a etiologia permaneceria desconhecida na maioria dos casos, pois até hoje muito

pouco se sabe a respeito. *Nestes casos, as enteromegalias seriam doenças congênitas, mesmo se manifestadas a partir da idade adulta.*

9. Para dirimir as dúvidas sugeridas por esta pesquisa, compete:

a) estudar de maneira sistemática o tronco-cerebral e a medula dos casos de megacólon;

b) o tronco cerebral deve ser estudado em cortes seriados do bulbo (sede do núcleo cárdio-pneumo-entérico ou dorsal do vago) e a medula em cortes semi-seriados de segmentos identificados quanto ao metâmero, a partir das raízes nervosas;

c) determinar qual o segmento intestinal dilatado e verificar, a jusante, se o segmento estreitado coincide com um dos esfíncteres conhecidos da Anatomia, ou não. É evidente que esta verificação pode ser aleatória, dados os fenômenos pós-mortais.

CONCLUSÕES

1. A medula espinhal nos casos de megacólon apresenta lesões que atingem os centros e os núcleos motores simpáticos.

2. As lesões medulares são, com grande probabilidade:

a) apenas disgenéticas, na grande maioria dos casos; b) de natureza apenas degenerativa, em algumas vezes; c) em outras, de natureza combinada.

3. Para saber-se com certeza se existe megacólon adquirido puro ou se produzido exclusivamente por lesões adquiridas dos centros e núcleos simtodo megacólon tem um componente congênito, isto é, se existe megacólon páticos do neuro-eixo ou se em todo megacólon existem alterações de desenvolvimento desses mesmos centros e núcleos, se impõe o estudo sistemático do tronco cerebral (mais particularmente do bulbo, onde se localiza o núcleo cárdio-pneumo-entérico), além do estudo também sistemático da medula espinhal.



MODELOS EM MADEIRA DAS DIFERENTES ALTURAS DA MEDULA PARA ESTUDO DOS EFEITOS DOS DIFERENTES PLANOS DE CORTE SOBRE A MORFOLOGIA DA SUPERFÍCIE DE CORTE

Legenda:

a – superfície de corte transversal (normal para a altura)

b – plano de secção inclinado: a imagem refletida no espelho permite identificar a direção do plano

c – superfície de corte do plano de secção inclinado

PLANO DE CORTE DE CIMA PARA BAIXO E DA FRENTE PARA TRÁS OU ESQUERDA OU VICE-VERSA

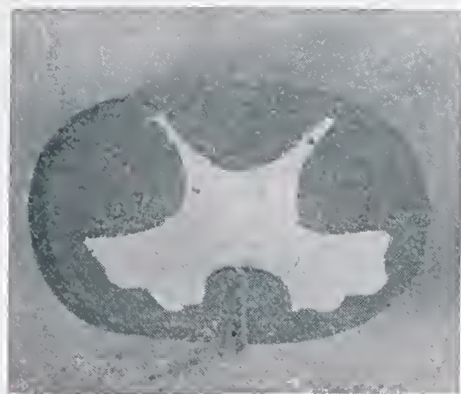


a

Cervical



b



c

Fig. 70

PLANO DE CORTE DE CIMA PARA BAIXO E DA DIREITA PARA A ESQUERDA OU VICE-VERSA (cont.)



a



b

L
o
m
b
a
r



c

Fig. 71

PLANO DE CORTE DE CIMA PARA BAIXO E DA DIREITA PARA A ESQUERDA VICE VERSA (cont.)



b



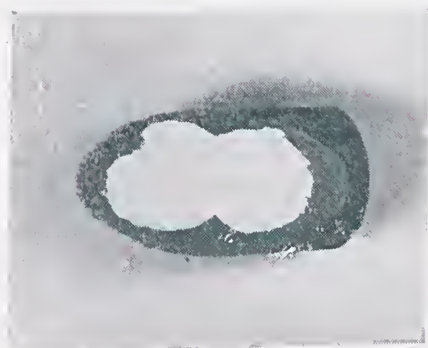
a



c

Fig. 72

Torácica



c



b

Fig. 73

Sagrada

FLANO DE CORTE DE CIMA PARA BAIXO E DA FRENTE PARA TRÁS OU VIÇE VERSA



a



b

C e r v i c a l



c

Fig. 74

PLANO DE CORTE DE CIMA PARA BAIXO E DA FRENTE PARA TRÁS ou VICE-VERSA (cont.)



a



Lombar

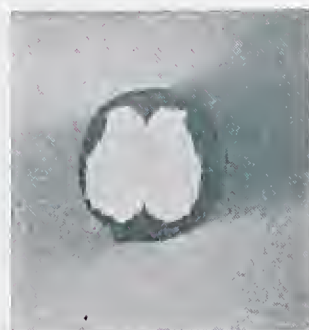
b



c

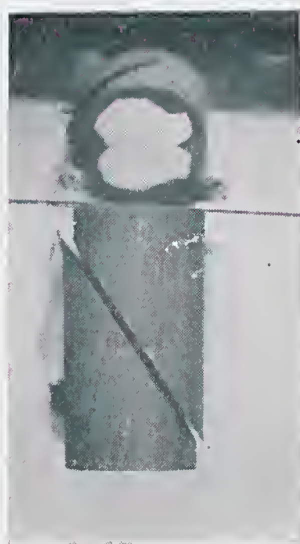
Fig. 75

PLANO DE CORTE DE CIMA PARA BAIXO E DA FRENTE PARA TRÁS ou VICE-VERSA (cont.)



a

S
a
g
r
a
d
a



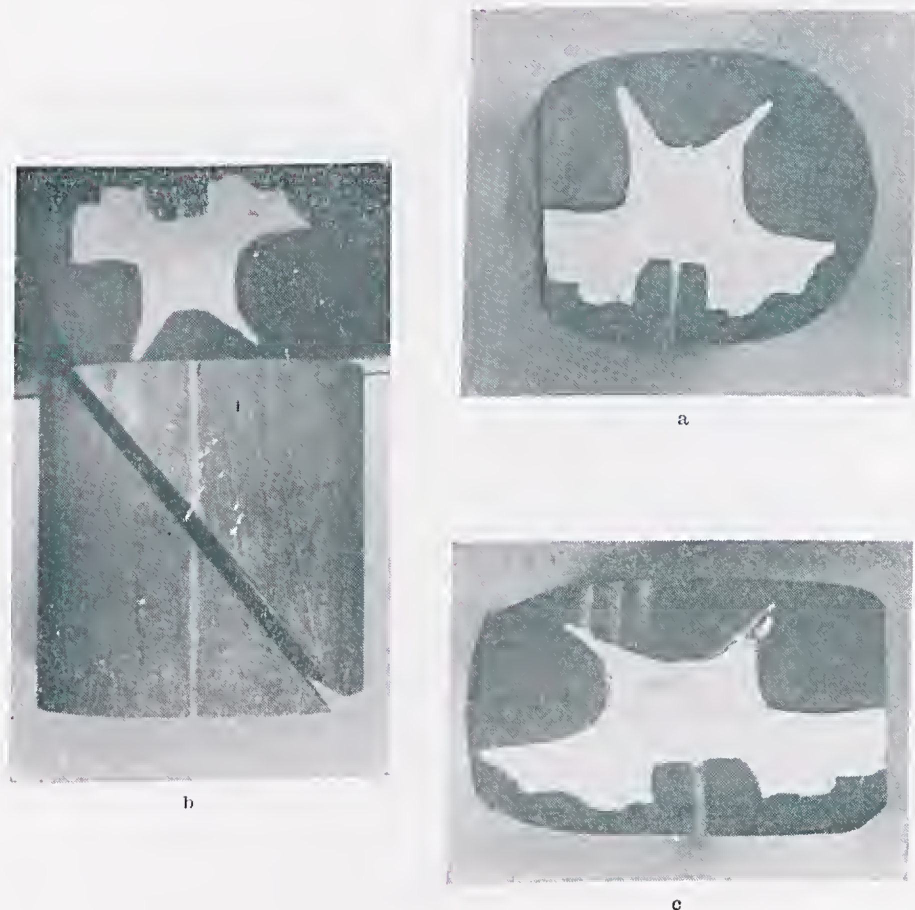
b



c

Fig. 76

PLANO DE CORTE DE CIMA PARA BAIXO E DA DIREITA PARA A ESQUERDA OU VICE-VERSA, QUE ENTALHA AS SUPERFICIES DE CORTE HORIZONTAIS



a

b

c

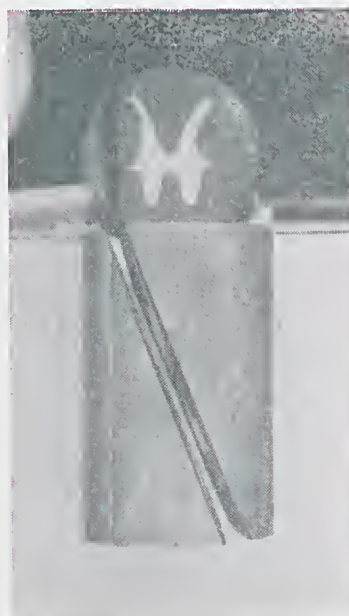
Cervical

Fig. 77

PLANO DE CORTE DE CIMA PARA BAIXO E DA DIREITA PARA A ESQUERDA OU VICE-VERSA, QUE ENTALHA AS SUPERFICIES DE CORTE HORIZONTAIS (cont.)



a



b

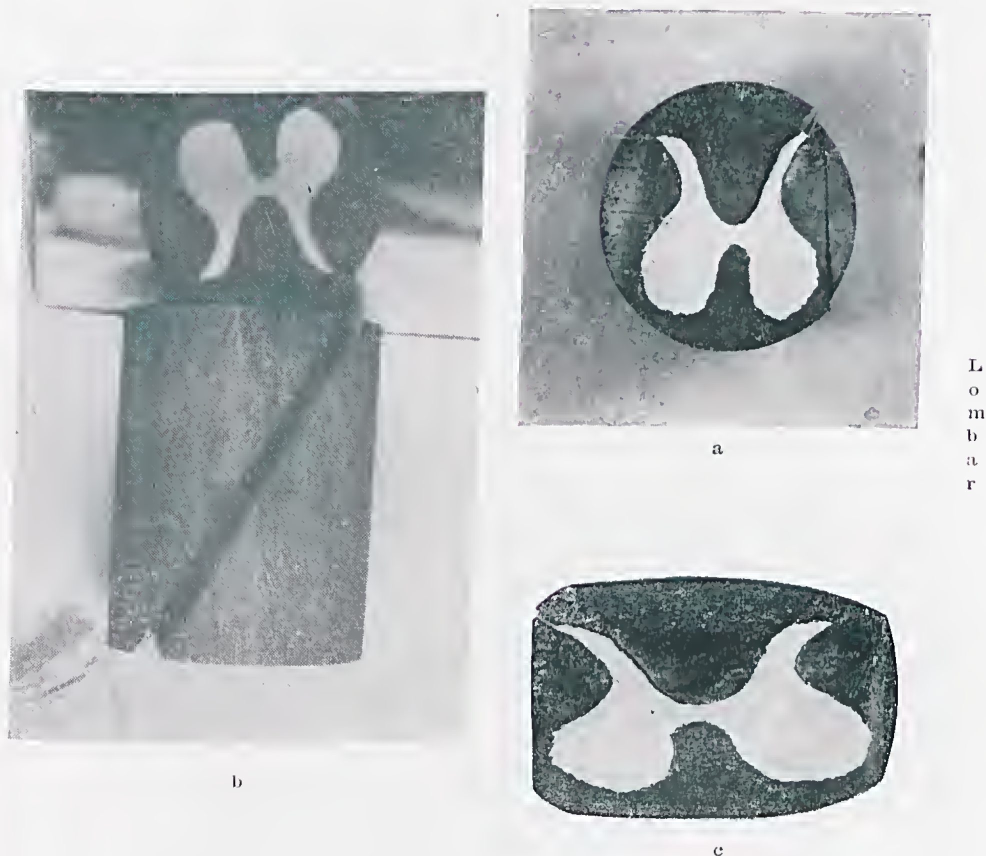
Toirácica



c

Fig. 78

PLANO DE CORTE DE CIMA PARA BAIXO E DA DIREITA PARA A ESQUERDA OU VICE-VERSA, QUE ENTALHA AS SUPERFICIES DE DE CORTE HORIZONTAIS (cont.)



a

L
o
m
b
a
r

b

c

Fig. 79

PLANO DE CORTE DE CIMA PARA BAIXO E DA DIREITA PARA A ESQUERDA OU VICE-VERSA, QUE ENTALHA AS SUPERFICIES DE DE CORTE HORIZONTAIS (cont.)

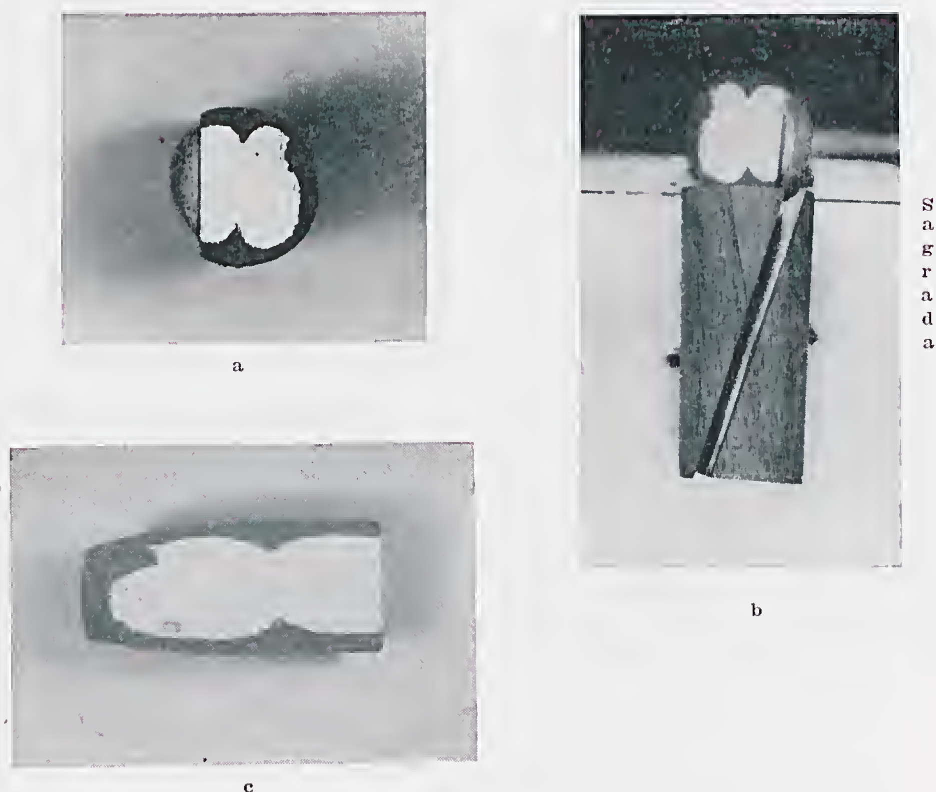


Fig. 80

SUMMARY — The A. studied the spinal cord of 21 eases of megaeolon, by means of semi-serial mieroseopie sections, and confirmed dysgenetic lesions in 18 of them, while acquired degenerative lesions were found in two and combined lesions in one.

In the two cases with acquired lesions, atrophy of sympathetic motor nuelei were found (secondary lesions); in 15 of the 19 cases with dysgenetic cordal lesions (including that with eombined lesions), aplasia, hypoplasia and dysplasia of sympathetic motor nuelei (primary) were found; on the remnant cases, the developmental changes did not allow to identify the same nuclei.

The A. considers such data of outstanding significanee to explain the pathogenetie mechanism of megacolon, since the linkage between the spinal cord and the intestine is established by the two motor and by the sensitive peripherie sympathetic neurones.

But, considering the anatomy of the Autonomous Neural System, the A. considers the study of the spinal eord insufficient to evaluate the participation of all the sympathetie centers and nuclei in that mechanism, and concludes that systematic researeh in the brain stem is necessary, in particular of the medulla oblongata, where the eardiopneumoenteric (dorsal) nucleus of the X pair is localized.

In his work the A. shows the ineonsistency of the theory of Koeberle et al., that attributes the etiology of megacolon to the Chagas' disease.

UNITERMS — Megacolon; spinal cord developmental ehanges; spinal eord dysgenesias; abdominal Autonomic Nervous System.

BIBLIOGRAFIA

1. AMORIM, M.; CORRÊA NETTO, A. — Histopathologia e pathogenese do megaesophago e megarecto. *An. Fac. Med. São Paulo*, 8: 101-127, 1932.
2. ATIAS, A.; MACKAY, L. A.; CAMPERO, E.; PARROCHIA, E.; JARPA, S.; PIZARRO, D.; SILVA, M. — Megaesofago y enfermedad de Chagas: primeros casos deseritos em Chile. *Bol. Chil. Parasit.* **17**: 20-23, 1962.
3. BRASIL, A. — Aperistalsis of the oesophagus. *Rev. Bras. Gastroent.* **7**: 21-28, 1955.
4. CANNON, W. B. — A law of denervation. *The Am. J. of Med. Sciences*, **198**: 737-750, 1959.
5. CHAGAS, C. — Tripanosomiase americana (Forma aguda de moléstia). *Mem. Inst. Osw. Cruz*, **8**: 37-59, 1916.
6. CHUSID, J. G.; McDONALD, J. J. — Neuroanatomia Correlativa y Neurologia Funeional, trad. G. Anguiano L., El Manuel Moderno S/A., México, 13a. ed., 1968.
7. HIGGS, B.; KERR, F. W. L.; ELLIS Jr. F. H. — The experimental production of esophageal achalasia by eleetrolytie lesion of the medulla. *J. thorac. cardiovasc. Surg.*, **50**: 613, 1965. Citado por SMITH[25], p. 31.
8. HIRSCHSPRUNG, H. — Stuhltragheit Neugeborener infolge von Dilatation und Hypertrophie des Colons. *Jhrb. Kinderrhlkd.*, **27**: 1-7, 1888, eitado por KOEBERLE,[12].
9. KOEBERLE, F.; NADOR, E. — Etiologia e patogenia do megaesôfago no Brasil. *Revta. paul. Med.*, **47**: 643-661, 1955.
10. KOEBERLE, F. — Patogênese do megas. *Rev. Goiana Med.*, **2**: 101-110, 1956.
11. KOEBERLE, F. — Patologia y anatomia patológica de la enfermedad de Chagas. *Bol. Of. Sanit. Panamer.*, **51**: 404-428, 1961.
12. KOEBERLE, F. — Patogenia do megaesôfago brasileiro e europeu. *Rev. Goiana Med.*, **9**: 79-116, 1963.
13. KOEBERLE, F. — Patogenia da moléstia de Chagas. *Rev. Goiana Med.*, **11**: 238-260, 1965.

14. KUNTZ, A. — The autonomic Nervous System, Lea & Febiger. Philadelphia, 4a. ed., 1953.
15. LANGLEY, J. N. — The Autonomic Nervous System. Brain, vol XXVI. Citado por RANSON [23].
16. LANGLEY, J. N. — Some Observations on the Movements of the Intestines Before and After Degenerative Section of the Mesenteric Nerves. *J. of. Physiol.*, vol. XXXIII, p. 34. Citado por RANSON [23].
17. MAFFEI, W. E. — As bases anátomo-patológicas da Neuriatria e Psiquiatria. ed. part., São Paulo, vol. I, 1951, p. 80.
18. MAFFEI, W. E. — Anatomia patológica e patogenia dos "megas". *Arq. Hosp. S. Casa de S. Paulo*, 1: 247-263, 1954.
19. MAFFEI, W. E. — Os fundamentos da Medicina, Fundo Edit. Procienx. São Paulo, vol. I, 1967, p. 56.
20. MINEIRO, V. — Contribuição à etiologia do megaesôfago. *Rev. Goiana Med.*, 4: 29-34, 1958.
21. PRADO, A. ALMEIDA — Aspectos patológicos gerais da doença de Chagas. Rio de Janeiro, 1959. Citado por KOEBERLE [13].
22. RAMOS, J. — Doença de Chagas e Acalásia. *Anais do Congresso Interamer. sobre Doenças de Chagas*, 4: 1375-1406, 1963.
23. RANSON, S. W. — Anatomia do Sistema Nervoso, trad. O. Aidar, Ed. Renascença. São Paulo, 8ª ed., 1952.
24. REZENDE, J. M.; LAUAR, K. M. S.; OLIVEIRA, A. R. — Semelhança radiológica do bloqueio vagal farmacológico do estômago com a aperistalsis do esôfago grupo I. *Rev. Goiana Med.*, 9: 61-65, 1963.
25. SMITH, B. — The neuropathology of the alimentary tract, Edward Arnold Ltd. London, 1972, pp. 9 e 23.
26. TRUEUX, R. C. — Neuroanatomia humana, trad. A. Mosovich, El Ateneo. Buenos Aires, 4a. ed., 1963.
27. VIEIRA, C. B.; GODOY, R. A. — Resposta motora do esôfago não ectásico a agentes colinérgicos na moléstia de Chagas. *Rev. Goiana Med.*, 9: 21-28, 1963.
28. WHITE, J. C.; SMITHWICK, R. H.; SIMEONE, F. A. — The Autonomic Nervous System, The Macmillan Co. New York, 3a. ed., 1952.

Recebido para publicação em 17.IX.73.
Aceito para publicação em 06.XI.73.



Mem. Inst. Butantan
37: 233-238, 1973

OCORRÊNCIA DE NEOPLASIA MESENQUIMAL FUSO-CELULAR EM PEIXE DA ESPÉCIE *Moenkhausia dichroura* (Kner, 1858)

JESUS CARLOS MACHADO *
ISAO KONDA**
LILIANI SUSAN LIMA ***

Laboratório de Anatomia Patológica do I. Butantan
Disciplina de Patologia da Fac. Medicina de Catanduva

RESUMO — Descrevem os autores a presença de um Sarcoma fibroblástico de baixo grau histológico de malignidade na pele de um peixe da espécie *Moenkhausia dichroura* (Kner, 1948), encontrado no município de Borborema, Estado de S. Paulo, no porto de Laranja Azeda. Assinalam a importância do relato dessas neoplasias em peixes, principalmente tendo em vista o descarte de poluições ambientais.

UNITERMOS — Neoplasias. Neoplasias em Peixes.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de neoplasias espontâneas em peixes, até 1966, veio sendo publicada de forma fragmentária, não coordenada, e constituída por relatos isolados como por exemplo os de Lucké (1942), Gordon e Smith (1938) e Halver e Mitchel (1967).

A partir de 1966, o esforço conjunto do "National Cancer Institute" e do "Smithsonian Institute", permitiu a criação do "Registro de tumores em animais inferiores". Este registro vem sistematicamente catalogando a incidência de neoplasias em invertebrados e animais poiquilotermos.

Em 1969, a Universidade de South Dakota em Vermillion, estimulou um Simpósio organizado por O.W. Neuhaus e J. E. Halver cuja temática específica foi: "O Peixe na pesquisa". Nesse Simpósio foi dedicado um capítulo especial sobre neoplasias espontâneas e experimentais em peixes. Nele, podemos, desde logo, depreender as excelentes informações que são obtidas de relatos de neoplasias espontâneas nesses animais, relatos esses que permitem desde logo, não só valiosos dados estatísticos sobre a ocorrência e localização das Neoplasias nesses animais, como também tirar ilações sobre a ação de carcinogênicos em animais aquáticos relacionando-a também com possíveis poluições ambientais. Daí julgarmos oportuno a publicação do encontro de uma neoplasia

* Diretor da Divisão de Patologia do I. Butantan e Professor titular da Disciplina de Patologia da Fac. de Med. de Catanduva.
** Monitor da Disciplina de Patologia da FAMECA.
Apresentado em setembro de 1972 na Seção de Anatomia Patológica da Associação Paulista de Medicina presidida pelo Prof. W. E. Maffei.
*** Bolsista do FEDIB do I. Butantan. Trabalho realizado com auxílio do FEDIB.

Endereço para correspondência:
C.P. 65, São Paulo, Brasil.

fuso-celular espontânea em exemplar de *Moenkhausia dichroura* (Kner, 1858) em rio do Estado de São Paulo, Brasil.

MATERIAL E METODOS

Um dos autores do presente relato (I. Konda), apanhou no Rio Tietê no Município de Borborema, a 1.000 metros aproximadamente do porto de Laranja Azeda (desenho 5) um exemplar de peixe, catalogado pelo Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (Seção de Herpetologia), como pertencente a espécie *Moenkhausia dichroura* (Kner, 1858).

O exemplar medindo cerca de 15 cms. apresentava (fotos 1 e 2), no seu terço posterior, lado esquerdo, formação tumoral, ovalar, saliente, medindo 3,8 cms. de comprimento por 2,4 cms. de largura e 1,2 cms. de altura. A pigmentação da pele nesse local era mais escura. Ao corte observou-se que a neoplasia era de cor brancacenta, fasciculada, apresentando-se no derma, sem comprometer ou ulcerar a epiderme. Seus limites eram precisos, não havendo macroscopicamente comprometimento de estruturas profundas. A pigmentação era restrita a epiderme e não à neoplasia.

Foram efetuados numerosos cortes do tumor que, após inclusão em parafina, foram corados pela Hematoxilina e Eosina e Tri-crômico de Masson. Observou-se que a neoplasia era composta por feixes de células fusiformes que se entrecruzavam. Os núcleos alongados na maoiria, ovalares mais raramente (Microfotografias 3 e 4), mostraram cromatina regularmente bem distribuida. Alguns núcleos mostraram discreta intranquilidade. Raros feixes tumorais comprometiam a musculatura subjacente. A nossa conclusão foi a de que se tratava de um sarcoma fibroblástico de baixo grau histológico de malignidade, desde que a coloração pelo Tri-crômico de Masson mostrou serem as células fibroblastos, pois, se bem que discreta, havia produção de fibras de colágeno. O estroma tumoral mostrava evidente edema intersticial.

DISCUSSÃO

Na literatura oncológica tem sido relatada a presença de neoplasias em peixes. Gordon e Smith (1938) publicaram o achado de melanomas malignos nos peixes *Platypoecillus maculatus* e *Xiphophorus helleri.* Gorbman e Gordon (1951) demonstraram a ocorrência de elevada incidência de neoplasias espontâneas da tireóide em peixes mantidos em laboratórios da espécie *Xiphophorus montezumae.* Em outras duas espécies de *Xiphophorus* e quatro de *Platypoecillus,* mantidas em condições semelhantes esses tumores foram mais raros. Alguns tumores como os hepatomas, bem estudados por Halver e Mitchell (1967), mostraram ocorrência epidêmica em peixes das espécies *Salmo gairdneri. S. darki* e *S. trutta* em várias localidades dos Estados Unidos e Europa.

Sobre neoplasias fuso-celulares temos a descrição de Lucké em 1942 que relacionou-as com Schwanomas humanos. R. Walker (1948 e 1961) relatou a presença de tumores múltiplos na pele de *Stizostedion vitreum,* possivelmente



fibromas ou fibrosarcomas. Nesses tumores foram descritas a presença de partículas semelhantes a virus de cerca de 1.000 Å de diâmetro.

O nosso caso mostrou ser uma neoplasia fuso-celular, dispostas em feixes entrecruzados e que pela coloração pelo Tri-crômico de Masson mostrou produção de fibrilas colágenas. Portanto a neoplasia se cataloga entre os tumores fibroblásticos e não entre os Schwanomas. Apesar do tumor ser bem diferenciado, encontramos uma certa intranqüilidade nuclear que apesar de discreta (microfotos 3 e 4) cremos poder nos permitir dar o diagnóstico de sarcoma fibroblástico de baixo grau histológico de malignidade. Apesar do cuidado com que os patologistas referem-se a essas neoplasias nos peixes, a insinuação dos feixes tumorais por entre as fibras musculares no nosso caso, reforça o diagnóstico.

SUMMARY — The AA. describe a fibioblast sacoma, with a low histological degree of malignancy, on the skin of the fish species *Moenkhausia dichroura*, found in the municipality of Borborema, State of São Paulo, at Laranja Azeda harbor.

The importance of reporting these neoplasias in fish is emphasized mainly with regard to the discharge of environmental pollution.

UNITERMS — Neoplasias. Neoplasias in fish.

BIBLIOGRAFIA

1. GORBMAN, A. & GORDON, M. — Spontaneous thyroidal tumors in swordtail *Xiphophorus montezumae*. *Cancer Res.*, 11: 184-187, 1951.

2. GORDON, M. & SMITH, G. M. — The production of a melanotic neoplastic disease by selective matings: IV Genetics of Geographical species hybrids. *Am. J. Cancer*, 34: 543-546, 1938.

3. HALVER, J. E. & MITCHELL, in NEUHAUS, O. W. & HALVER, JE. — Fish in Research. Academic Press, London, 1869.

4. LUCKÉ, B. — Tumors of the nerve sheats in fishes of the snapper family (Lutianidas). *Arch. Path.*, 34: 133-150, 1942.

5. NEUHAUS, O. W. & HALVER, J. E. — "Fish in Research". Academic Press, London, 1969.

6. WALKER, R. — Lymphocystic warts and skin tumors of walleyed pike Rensselaer Polytech, 14, Troy, 1948.

7. WALKER, R. — *Amer. Zool.*, 1: 395-397, 1961.

Recebido para publicação em 20.VII.73.
Aceito para publicação em 20.VIII.73.

MACHADO, J. C., KONDA, I. & LIMA, L. S. — Ocorrência de neoplasia fuso-celular em peixe da espécie *Moenkhausia dichroura* (Kner, 1858).
Mem. Inst. Butantan, *37*: 233-238, 1973.

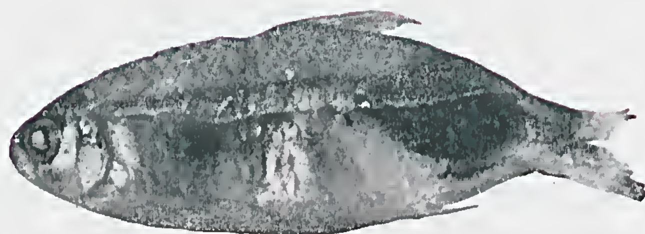


Foto 1: Fotografia lateral do exemplar de *Moenkhausia dichroura* (Kner, 1858), mostrando o tumor no seu terço posterior.



Foto 2: Fotografia de *Moenkhausia dichroura* (Kner, 1858), mostrando a saliência tumoral no terço posterior do exemplar.



Foto 3: Microfotografia do tumor mostrando ser composto por feixes de células fusiformes com moderada produção de fibrilas observáveis no estroma que está edemaciado.

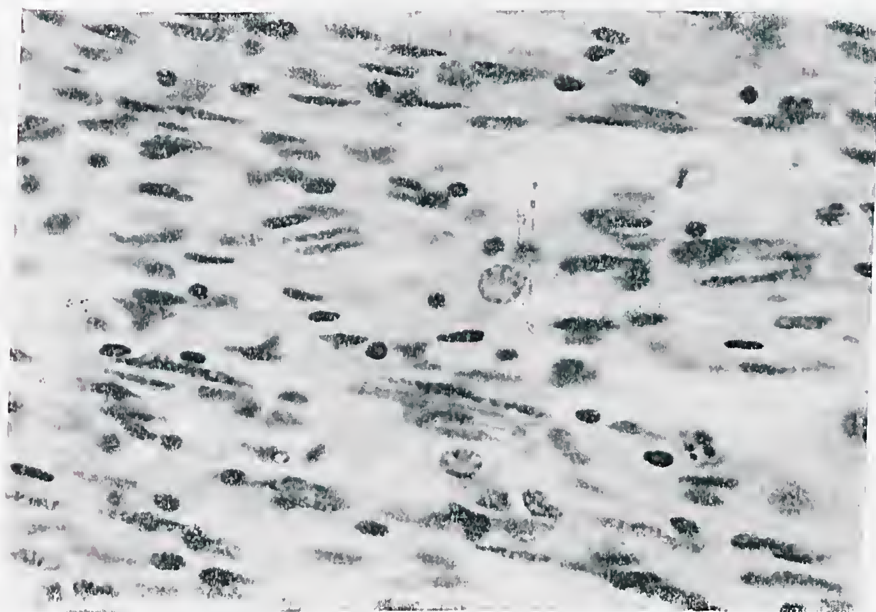


Foto 4: Microfotografia evidenciando moderado polimorfismo e diferenças tintoriais nos núcleos dos elementos neoplásicos.

MACHADO, J. C., KONDA, I. & LIMA, L. S. — Ocorrência de neoplasia fuso-celular em peixe da espécie *Moenkhausia dichroura* (Kner, 1858).
Mem. Inst. Butantan, 37: 233-238, 1973.



Desenho 5

Mem. Inst. Butantan
37: 239-251, 1973

ANOMALIAS CONGÊNITAS EM UMA NINHADA DE "CASCAVÉIS" *

FRANCISCO GARCIA DE LANGLADA **

Laboratório de Biopatologia de Serpentes
Seção Anatomia Patológica — I. Butantan

RESUMO — Foram encontrados em 20 exemplares de filhotes de *Crotalus durissus terrificus* nascidos em cativeiro, agenesias de pupila, intestino grosso, cloaca e órgãos genitais.

Anomalia das presas, esôfago, estômago, intestino delgado, fígado, rins, ureteres e orifício cloacal ocorreram também nos mesmos filhotes observados.

Desvio de coportamento, hábitos e reações também foram constatados nos mesmos exemplares, por comparação com individuos normais.

UNITERMOS — Ninhada anômala de cascavéis.

INTRODUÇÃO

No desenvolvimento dos trabalhos que nosso laboratório realiza sobre reprodução artificial e adaptação a cativeiro de serpentes venenosas, encontramos uma ninhada de cascaveis, cujas anomalias nos pareceu útil descrever já que não encontramos semelhantes na literatura.

Procedente da Fazenda São Joaquim, do Instituto Butantan, situada em São Roque (SP), chegou ao nosso laboratório um exemplar de *Crotalus durissus terrificus* fêmea, adulta, em bom estado de saúde, sem sinais externos de trauma ou ferimentos, com 120 cm de comprimento e 1,280 quilos de peso com oito aneis no guizo e com evidentes sinais de prenhez.

Foi posta em observação em local em que existia possibilidade de locomoção, com água corrente e temperatura controlada, que oscilava entre 26° e 28°C. Alimentou-se espontâneamente duas vezes, com camundongo branco de laboratório, com intervalo de dez dias. Bebia água, evacuava fezes normais que depositava a maioria das vezes na água corrente.

Permanecia por longos períodos de tempo com a porção caudal introduzida na água. Tinha agressividade normal que se acentuou à medida que o parto se aproximava. Locomovia-se pouco. Ignoramos a paternidade e a data da cópula.

---

* Comunicado na XIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Rio de Janeiro, GB — 12.Julho.1967.

** Assistente do Instituto Butantan.

* Trabalho realizado com auxílio do CNPq.
Trabalho realizado com auxílio do FEDIB.

Endereço para correspondência:
C.P. 65, São Paulo, Brasil.

Após 49 dias de laboratório a serpente pariu espontaneamente 20 filhotes, sendo os 17 primeiros vivos e os 3 últimos mortos. Durante todo o trabalho de parto a fêmea não se deslocou do local. Os períodos de expulsão eram curtos de 30 a 60 segundos, com intervalos de 10 a 20 minutos entre uma expulsão e outra.

Permaneceu em repouso a maior parte do tempo durante 44 dias em que sobreviveu ao parto. Não mais se alimentou, bebeu pouco e não procurou mais a água para suas evacuações ou para submergir a porção caudal. Veio a falecer no 44º dia após o parto.

Na autopsia encontramos ampla necrose com perfuração extensa do oviduto direito que exteriorizava 3 filhotes em avançado estado de putrefação. Peritonite com abudante exsudato de aspecto mucopurulento na cavidade abdominal. Demos como "causa mortis": Toxemia.

MATERIAL E MÉTODOS

Usamos como material de estudo os próprios filhotes da ninhada nascida em nosso laboratório, objeto deste trabalho.

Como método essencial de trabalho usamos a comparação dos dados físicos e de comportamento da ninhada referida, com os mesmos dados por nós registrados na observação de ninhadas de outras serpentes do mesmo gênero, também nascidas em nosso laboratório, e que já vinhamos observando de longa data com o fim de estabelecer um critério padrão de vida, crescimento, comportamento, etc... do filhote de *Crotalus* (Estas observações serão motivo de próxima publicação).

Logo após a parto, separamos a ninhada para exame físico, pesagem, medida e outras observações.

Um dos filhotes morreu dentro das primeiras 24 horas. Na necropsia encontramos várias agenesias e anomalias.

Passadas as primeiras 24 horas os 16 filhotes vivos foram isolados em uma caixa de madeira de 9 m² de superfície e cujo fundo foi recoberto em porções iguais de terra seca, terra úmida, areia seca, areia úmida, pedregulhos, paus secos, capim seco e uma porção livre do próprio chão que é de cimento. Isto tudo para conhecer as preferências individuais ou de grupo pelo tipo de solo.

Sobre cada amostra de solo foi colocada uma pequena abóbada de papelão que permita a idéia de "toca".

No centro da caixa existia uma goteira de 2,50 metros com areia, terra o pedras pela qual era mantida água corrente. A temperatura ambiente foi controlada entre 25º e 28ºC. Não nos foi possível determinar a umidade relativa nem a pressão atmosférica.

Das observações da ninhada, pudemos anotar as seguintes alterações de comportamento em relação aos recém-nascidos normais, cuja conduta foi padronizada pela observação de cerca de 1000 exemplares nascidos em nosso laboratório.

Desde que nosso estudo é comparativo, exporemos sempre juntos, os resultados dos normais e dos observados como segue.



A) Peso e Medida individuais:

Os filhotes da ninhada em estudo, apresentavam-se em bom estado de saúde.

Peso e medida estavam dentro dos limites que admitimos como normais: peso médio 27,5 g e 23,5 cm de comprimento.

B) Presas

No filhote que consideramos como normal, as presas são em número de duas, recobertas por mucosa e de tamanho capaz a permitir facilmente sua exteriorização.

Nos filhotes em estudo, encontramos em 6 deles, presas duplas em ambos os lados, de diâmetro normal mas de comprimento tão exagerado a ponto de não poderem ser exteriorizadas pela abertura da cavidade bucal.

Uma outra anomalia constatada na cavidade bucal foi a ausência das fileiras de pequenos dentes paralelos à fissura palatina.

C) Troca de Pele

Nas observações de filhotes normais, anotamos a primeira troca de pele entre as 24 e 48 horas após o nascimento. Na ninhada observada, somente alguns exemplares trocaram de pele, fazendo-o apenas após o 4.º dia de vida.

D) Olhos

Nos filhotes da ninhada em estudo, constatamos a ausência de pupila em todos os exemplares. Apresentavam olhos cor azul celeste, límpidos e brilhantes, semelhantes aos das serpentes albinas, independendo esta cor das mudanças de pele, o que nos assegurou não ser o desprendimento desta, a causa aparente da ausência de pupila.

E) Agressividade

O filhote normal é extremamente agressivo à aproximação de qualquer objeto estranho, que desencadeia nele um movimento rápido para armar o bote, um movimento vibratório de agitação de cauda, e uma agressão em forma de picada, com golpes rápidos e certeiros bem dirigidos ao objeto de que se quer defender.

Os filhotes observados armam o bote como os normais mas não agitam a cauda e agridem indistintamente em qualquer direção não reagindo rapidamente à presença de objetos estranhos próximos, e não coordenando a direção do bote para o objeto; pelo contrário, agrediam em picadas dirigidas a todos os lados, sem método ou controle, dando-nos a impressão de perceberem o objeto estranho sendo, no entanto, incapazes de situá-lo.

F) Pesquisa do ambiente

Os normais o fazem com a língua em movimentação rápida no sentido vertical e antero-posterior; os da ninhada observada exteriorizavam lentamente a língua, sem fazer movimentos com ela.

G) Percepção

As serpentes adultas, quando em cativeiro, apresentam uma espécie de "curiosidade" pelos objetos estranhos levados junto a elas e os "estudam" e "pesquisam" com a língua (C. B. Perkins, 1942); observamos esta mesma conduta nos filhotes normais. Os filhotes anormais por nós observados, permaneciam entretanto, completamente indiferentes diante de quaisquer objetos.

Noble, 1934 e Noble e Schmidt, 1937, descrevem uma percepção do calor até com variações de 2°C da temperatura ambiente e que é acusada pelas serpentes pela movimentação de sua cabeça em direção ao foco de maior calor. Para nosso teste usamos um ferro aquecido a 100°C mais ou menos, que passávamos lentamente a várias distâncias das serpentes e pudemos verificar que as normais o "percebiam" desde a distância de 50 cm até a distância máxima de 10 metros. As observadas nunca o "percebiam" ou melhor, nunca deram demonstração alguma de que o percebessem, em nenhuma distância.

H) Luz artificial dirigida:

Quando em plena escuridão fazemos incidir um feixe de luz diretamente sobre um filhote de cascavel, verificamos que após curto espaço de tempo o animal se locomove, procurando novamente a sombra, enquanto que as por nós observadas permaneciam imóveis.

I) Movimentação

Consideramos como comportamento normal, o dos filhotes repousarem enrolados, isolada ou agrupadamente durante o dia, dando preferência a áreas secas e utilizando-se, quase sempre, das "tocas" artificiais de papelão.

Estes filhotes, à noite, percorrem a área de cativeiro indistintamente em todas as direções.

Na ninhada observada, os filhotes se locomoviam durante o dia e, curiosamente, todos sempre na mesma direção, seguindo o sentido dos ponteiros do relógio. Mesmo quando interceptada, por nós, sua marcha, tornavam a caminhar no sentido dos ponteiros do relógio. Descansavam à noite, isolados, sem se enrolarem e sem procurarem o abrigo das "tocas" e, preferentemente, sobre terra úmida.

J) Reptação em plano inclinado

Usamos para esta prova uma prancha de papelão colocada no chão da caixa onde vivem os filhotes.

Quando um deles se aproxima de uma das extremidades da prancha, elevamos a outra até obtermos um plano inclinado de 45° aproximadamente. Os filhotes normais, quando sobem pela prancha, fazem um percurso de 1 m com duas ou tres paradas no caminho. As observadas, quando tentavam subir na prancha, desistiam a poucos centímetros do início, deixando-se cair para os lados.

K) Agrupamento

Os normais descansam enrolados sobre si mesmos e geralmente procuram agrupar-se, enquanto que os da ninhada em estudo permaneciam estirados e não se agrupavam.

L) Alimentação

Usamos para alimentação camundongos recem-nascidos. Os normais agridem, matam e ingerem a presa, os da ninhada em estudo agrediam, matavam, mas não ingeriam a presa.

M) Água

Os normais procuram ao longo do "rio" um lugar adequado em profundidade e correnteza para beber, com escolha nítida do local, mantendo sempre o corpo fora da água, quando bebem, enquanto que na ninhada observada, os filhotes vão para a beira da água, sem escolha do local, introduzindo, por vezes, o corpo inteiro na água, para beber.

Das necropsias

À medida que os filhotes iam morrendo eram realizadas necrópsias que nos permitiram constatar uma série de agenesias e anomalias internas.

Estas necrópsias, que foram feitas dentro do possível, pelo mesmo método que as autopsias humanas, mostraram os resultados que serão a seguir relatados.

Omitiremos a citação das vísceras que não apresentavam alterações macroscópicas.

Em 12 espécimens encontramos fígado mole e rosado, que nada lembra o comumente achado de cor marrom vinhosa.

A vesícula biliar, nos exemplares que tiveram maior sobrevivência, apresentava engurgitamento. Grande infiltração biliar foi encontrada tanto no intestino delgado quanto no grosso.

O intestino delgado apresentava-se na quase totalidade dos casos com ausência de alças, como um tubo reto, de paredes espessas com consistência muito aumentada e pouca flexibilidade (aspecto de papelão).

O intestino grosso, em todos os casos, apresentava-se imperfurado terminando em fundo de saco e continha fezes amarelas em maior ou menor quantidade.

Em 12 casos, encontramos união do fundo de saco do intestino grosso à parede abdominal, na altura do úraco. Este foi encontrado nos mesmos 12 filhotes, recoberto por panículo adiposo com aspecto de gomo de tangerina.

Em 2 casos, encontramos vestígios de cloaca, sem conteúdo fecal, apenas com escassa urina.

Em 3 casos, os rins se apresentavam divididos em segmentos separados entre si, ligados apenas pelo pedículo vascular; em 10 exemplares, havia ausência de ureteres e em 1 dos exemplares, os mesmos terminavam no antro cloacal.

Em 16 casos, os rins eram fortemente bocelados, com aspecto e consistência de rim adulto de serpente.

Foi notada ausência de órgãos sexuais em todos os casos.

Damos, a seguir, uma tabela que resume todos os dados das anomalias encontradas e sua freqüência e as fotografias que mostram algumas destas anomalias.

SUMMARY — In 20 young specimens of *Crotalus terrificus* born in captivity, agenesias of the pupil, large intestine, cloaca, and the genital organs were found.
Anomalies of the fangs. esophagus, stomach, small intestine, liver, kidneys, ureters and cloaca were also found in the same newly hatched snakes.

The same specimens showed furthermore deviations of behavior, habits and reactions, as compared to normal individuals.

UNITERMS — Anomalous hatch of rattlesnakes.

Recebido para publicação em 10.VIII.73
Aceito para publicação em 18.IX.73

AGENESIAS E ANOMALIAS

Comprimento médio ao nascer	23,5 cm
Peso médio ao nascer	27,5 g
Comprimento médio pós morte	38,7 cm
Peso médio pós morte	36,5 g

Número de ordem do filhote	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Dias de vida	1	4	6	6	12	12	12	12	18	18	29	29	30	30	33	35	38
Olhos sem pupila	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Traquéia estenosada		x															
Estômago atrófico		x															
Intestino delgado sem alças	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
Intestino grosso ausente	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Cloaca ausente	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Fígado de cor rosada	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x				
Rim segmentado						x							x		x		
Rim bocelado igual ao adulto	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x
Ureteres ausentes	x	x	x	x	x	x	x	x			x				x		
Ureteres terminando na cloaca									x								
Uraco recoberto por p. adiposo	x	x		x			x	x	x	x		x	x		x	x	x
Gônadas ausentes	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Hemipenis ausentes	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Vaginas ausentes	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Trocas de pele após o parto			x	x		x			x				x			x	
Não trocam nunca de pele	x	x			x		x	x		x	x	x		x	x		x

puzzling are the references made to these 'giant' serpents under the names of 'boiguaçu', 'jibóya', or 'cobra de veado', and 'boi guaçu' or 'cobra de veado', respectively, by W. Piso and G. Marcgravius in Historia Naturalis Brasiliae, Ed. F. Hackium, Leyden & L. Elzevirium, Amsterdam, 1648, ch. III & ch. XIII, fig...

In this connexion the following facts must be reminded:

1. The terrestrial species preferably feeds on rodents (mice,rats, cavies, rock-cavies, hares, pacas and agoutis) such preys being compatible with its size and particular ecology; and so it seldom needs to resort to constriction, excepting when it catches some 'suaçu-berá' (*Mazama simplicicornis*) at the caatinga edge, where it uses to hunt; thence comes its name 'deer-snake' as repeated by Marcgrave and by M. Wied.

2. The aquatic (amphibious) species is omnicarnivorous, irrestrictly feeding, first, on fish and frogs; later, on birds, peccaries, deer, etc., in accord with its body size and stomach capacity as well as with the facilities found in its double habitat: therefore, it resorts to constriction as a rule.

3. Linné was apparently induced to apply in his Syst. Naturae (1758) the name *murina* to the water boa in view of the rat-hunting tendency ("murium insidiator") that Seba assigned to this snake in R. Natur. Thesauri (1735), in table 29 of which a rat was figured (fig. 1) aside (although at a lower level) the snake.

4. Certainly impressed by the errors his predecessors made in this field in most ancient publications (especially Linné *in* Syst. Naturae, 1758; Laurentius *in* Syn. Reptilium, 1768; Lacépède *in* Hist. Nat. Reptiles, 1801; Schneider *in* Hist. Amphibiorum, 1801; Daudin in Hist. Nat. Générale, 1803; and Merrem in Tent. Syst. Amphibiorum, 1820), Schlegel in Essai, 1837, seriously attempted at systematizing the question and establishing, in the light of more correct data on the range of several and important boids, a better basis for their distinction since their definitions were mostly founded on old, poorly preserved specimens in museum collections. And, on having a chance to deal with the water boa, he aptly remarked that Linné gave "à cette espéce un nom assez vague que les auteurs sependant ont conservé".

5. As to the real distinction between both of these conspicuous snakes, Wied, being — besides W. v. Eschwege (in J. v. Brasilien, Weimar, 1818, 2:276) — one of the few traveller-scientists ever to make direct acquaitance with such ophidians *in vivo* and in their natural habitat, was able to point out real morpho-biologic differences between *murina* and *constrictor*. However, in finally preparing the text of his remarkable monographs (Reise d. Brasilien, 1820; Beitr. zur Naturgeschichte v. Brasilien, 1825; and Abbildung, 1831), Wied still kept some confusion over them, in including, in the description of *constrictor*, particulars of "cobra de veado". As regards this Lusitan expression, which first appeared in Piso and Marcgravius' (1648) quoted monograph, our herpetologic and linguistic researches induce us to admit those authors having





Fig. 1 — Fotografia que mostra a cavidade bucal de um filhote da ninhada anômala em estudo; nota-se o desproporcional tamanho das prêsas que ultrapassam, quando retraídas, as comissuras labiais. Nota-se também a não existência de dentes nas bordas das fissuras palatinas.* Ponta terminal da Direita.

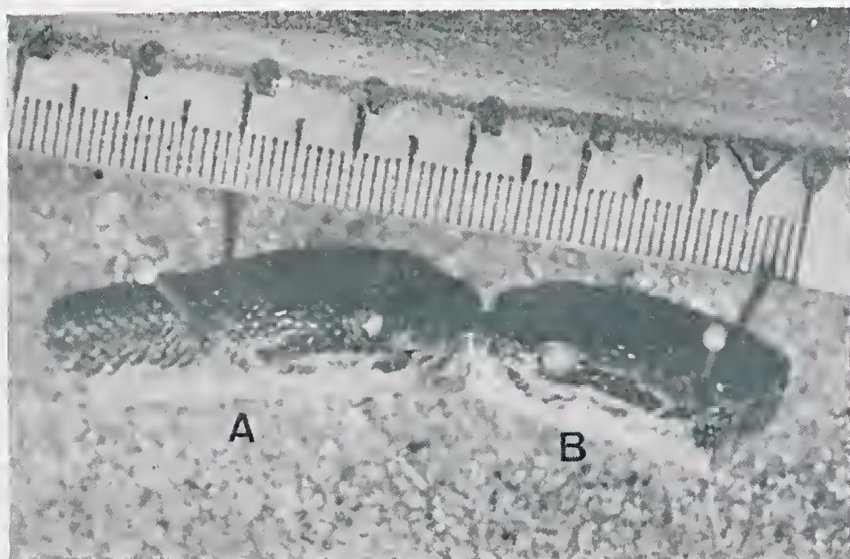


Fig. 2 — Fotografia que mostra a diferença entre um olho de filhote de serpente normal, "A" e o de um filhote da ninhada em estudo "B".
Note-se a ausência de pupila em "B"

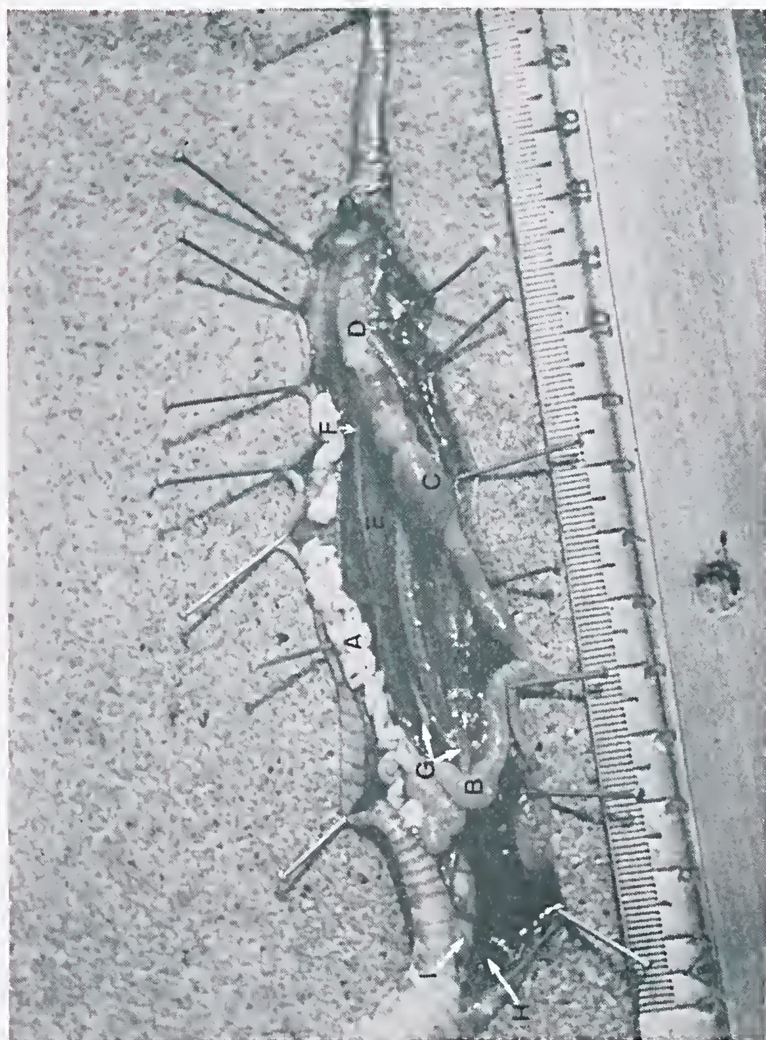


Fig. 3 — Fotografia de um filhote de cascavel com 16 dias de vida, normal com exposição das vísceras da cavidade ventral, em que vemos:

A) adiposidade mesentérica
B) intestino delgado em que se notam as circunvoluções das alças
C) intestino grosso
D) cloaca repleta de fezes e urina
E) rim esquerdo pouco bocelado, como é normal no filhote de serpente
F) feixo que corre paralelamente ao rim, formado por: vasos normais, ureteres e ducto espermático
G) testículos
H) fígado
I) estômago



Fig. 1 — Fotografia de um dos filhotes anômalos descritos com 8 dias de vida, mostrando as vísceras da cavidade ventral.

Observamos como anomalias:

B) intestino delgado sem circunvoluções das alças, e de consistência rija.
C) pequena porção do intestino grosso, que se apresentava imperfurado, terminando em forma de fundo de saco, em sua porção distal.
E) rins fortemente bocelados
K) antro da cloaca, imperfurado
Notar a ausência de cloaca, genitália e 2/3 do intestino grosso.

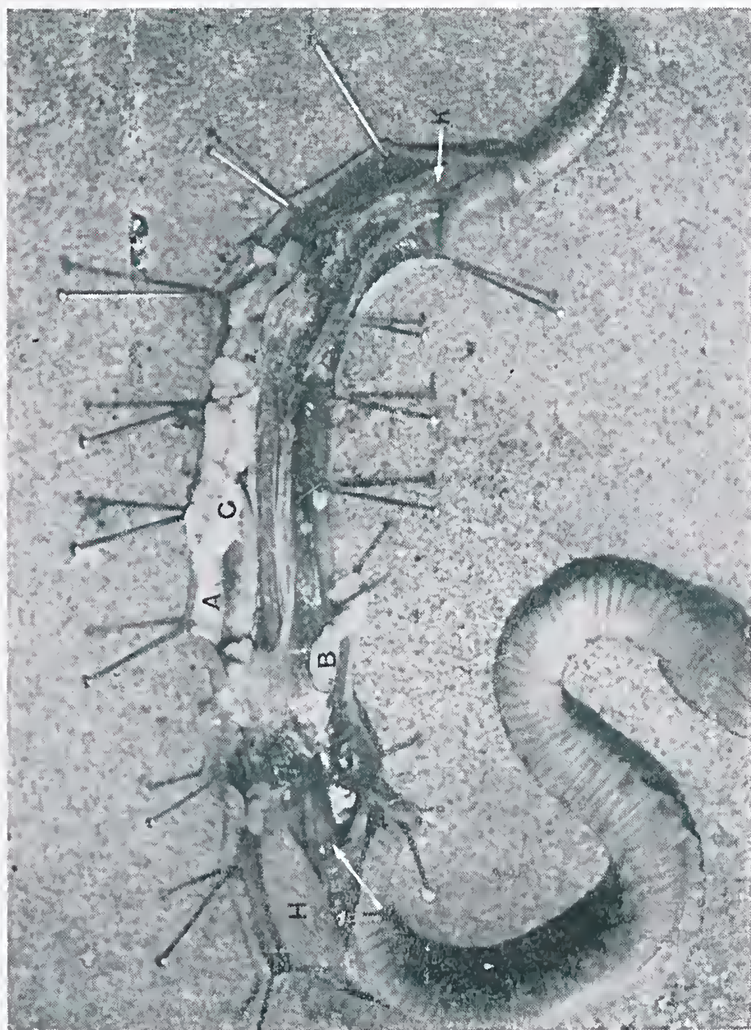


Fig. 5 — Fotografia de um dos filhotes anômalos descritos com 12 dias de vida, mostrando as vísceras da cavidade ventral.

Observamos como anomalias:

B) intestino delgado extremamente reduzido em seu comprimento, sem circunvoluções, sem alças, que foi por nós separado de C.

C) pequena porção de intestino grosso imperfurada e aderida em sua porção terminal à parede costal.

H) fígado que se apresentava de cor rosado pálido.

I) estômago

K) antro da cloaca, genitália e 5/8 do intestino grosso.



Fig. 6 — Fotografia de um dos filhotes anômalos, com 9 dias de vida, mostrando as vísceras da cavidade ventral.

Observamos como anomalias:

B) intestino delgado, sem circunvoluções nem alças fortemente estenosado desde 3,5 cm acima de sua junção com o intestino grosso.

C) intestino grosso reduzido a 3/8, aproximadamente, de seu tamanho normal, imperfurado e fixo à parede costal em sua porção terminal.

E) rins fortemente bocelados

K) antro da cloaca que apresentava um septo transverso, imperfurado e unido à musculatura dorsal interna.

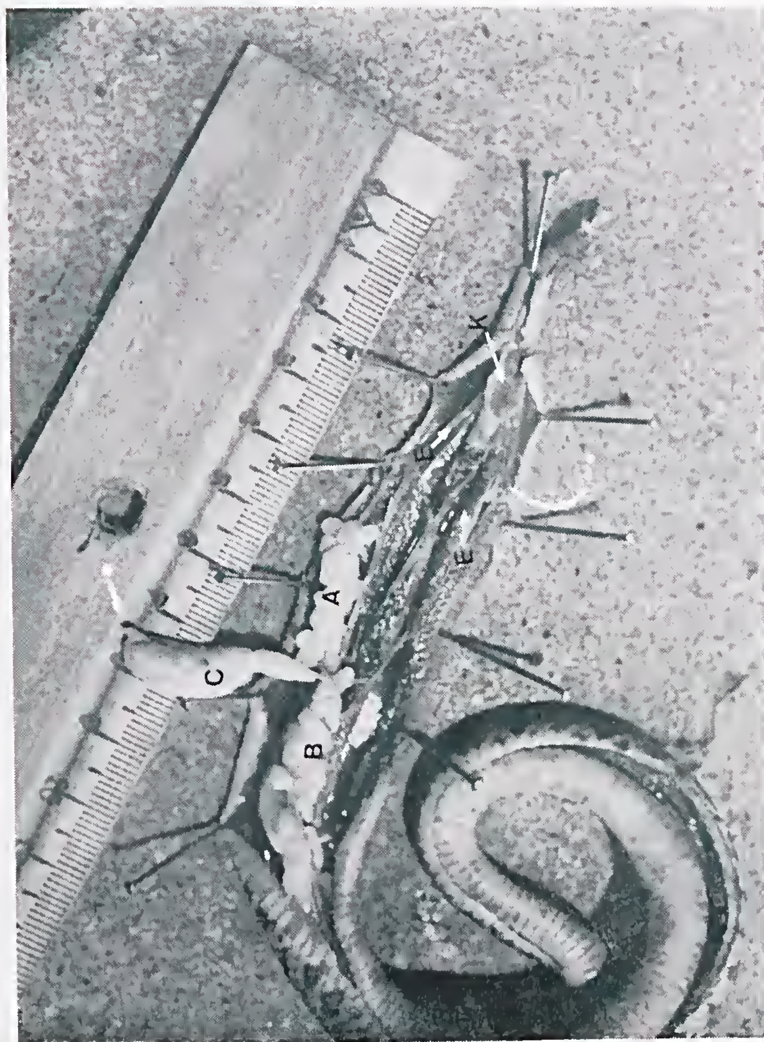


Fig. 7 — O mesmo filhote mostrado na Fig. 6, mostrando o pedículo (*) que unia C à parede ventral na altura do úraco (**).

BIBLIOGRAFIA

1. NOBLE, G. K. — The structure of the facial pit of the Pit Vipers and its probable function. *Anat. Rec.*, 58, supp. pp. 4, 1934.

2. NOBLE, G. K. & SCHMIDT, A. — The structure and function of the facial and labial pits of snakes. *Proc. Am. Philos. Soc.*, 77, n.º 3, 263-288, 1937.

3. PERKINS, C. B. — Something about Rattlesnakes. *Zoonooz.*, 15, *n.º* 11, pp. 4-5, 1942.

4. PERKINS, C. B. — More about Rattlesnakes. *Zoonooz.*, 15, n.º 12, pp. 5-6, 1942.


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

Mem. Inst. Butantan
37: 253-260, 1973

DETERMINAÇÃO DA ÉPOCA DE FECUNDIDADE EM FÊMEAS DO GÊNERO CROTALUS *

FRANCISCO GARCIA DE LANGLADA **
MARINEI FERREIRA GONÇALVES ***
EDNA TALARICO RODRIGUES ***

Laboratório de Biopatologia de Serpentes
Secção Anatomia Patológica — I. Butantan

RESUMO — Os autores tecem um estudo sobre a época de fecundidade em serpentes do gênero *Crotalus* do Estado de São Paulo.

Para tanto, pesquisam a presença de espermatozóides no trânsito genital de 1.522 fêmeas adultas, logo após a captura e por espaço de 4 anos, correlacionando a presença desses espermatozóides, com a época de fecundidade.

Ao mesmo tempo, analisam a sobrevida de espermatozóides inoculados artificialmente em 50 fêmeas, procurando determinar a sobrevida dos mesmos no aparelho genital feminino.

Realizam também, pesquisas anatômicas no sentido de encontrar espermateca ou lugar análogo no percurso genital da fêmea de *Crotalus*.

Concluem o trabalho, apresentando o tempo médio de sobrevida dos espermatozóides, não tendo encontrado condições anatômicas para estocagem de espermatozóides e dando a época própria para fecundação entre os meses de maio e outubro.

UNITERMOS — Época de fecundidade e sobrevida de espermatozóides no trânsito genital feminino em serpentes brasileiras do gênero *Crotalus*.

INTRODUÇÃO

Para poder levar a cabo os trabalhos de inseminação artificial que estamos realizando, já de longo tempo no laboratório, precisamos estudar, com exatidão, a época do ano em que as serpentes do gênero *Crotalus* (*C. d. terrificus* e *C. d. collelineatus*), do Estado de São Paulo, estão aptas a serem fecundadas.

Através da literatura pertinente consultada, que citamos na discussão, ficamos alertados da possibilidade de serpentes se reproduzirem em cativeiro, sucessivas vezes, sem presença de macho. Isto nos fez supor numa estocagem de espermatozoides de cópula anterior ou numa faculdade de retardar, quer a fecundação, quer o desenvolvimento embrionário.

* Comunicado III Congresso Bras. de Zoologia. Rio de Janeiro — 20.Jul.1968.

** Assistente do Instituto Butantan.

*** Bolsista do F.E.D.I.B.

* Trabalho realizado com auxílio do CNPq.

* Trabalho realizado com auxílio do FEDIB.

Essa mesma literatura dava-nos as idéias mais díspares sobre épocas de reprodução, dependendo, claro está, das espécies estudadas e das condições ecológicas das mesmas.

Além disso, quase todos estes trabalhos eram feitos por estudos histológicos do aparelho genital quer do macho, quer da fêmea, e, na maioria dos casos, com número extremamente pequeno de exemplares.

Sabíamos também pela literatura, das possibilidades do ciclo ♀ ser bienal, trienal e até mesmo com espaços maiores.

Sendo assim, parecia-nos que um estudo específico de nossa cascavél, detalhado e preciso, deveria ser feito, em grande número de exemplares, e por longo tempo, para podermos ter uma base firme em nossa inseminação artificial.

Este estudo foi planejado de forma a obter o maior número possível de respostas concretas a nossas interrogações, respostas estas que tentamos reunir, parte no presente trabalho, parte no já publicado "Ciclo Sexual Bienal de Serpentes *Crotalus* do Brasil" Comprovação. Memórias do Instituto Butantan, 36: 67-72, 1972, e ainda parte no "Estudo da cadeia hormonal de serpentes do gênero *Crotalus*" a ser publicado brevemente.

Para o desenvolvimento do presente trabalho, dividimos nossa pesquisa em dois campos:

1.º "Possibilidades de fecundação a longo prazo sem presença de macho", isto é, possibilidades de estocagem de espermatozóides, sobrevida dos mesmos no aparelho genital da fêmea ou possibilidades de retardo, quer da fecundação, quer do desenvolvimento do embrião (também na fêmea), após a cópula e,

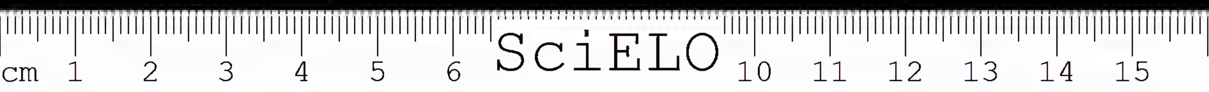
2.º Época de fecundidade das mesmas.

Para tanto procedemos da seguinte maneira:

MATERIAL E MÉTODOS

Como apenas o estudo histológico não nos fornecia dados suficientes a uma conclusão certa, já que não seria possível obter biopsias periódicas de um mesmo exemplar durante 2 ou 3 anos e que por outra parte, mesmo que as obtivéssemos, não poderíamos precisar quais as influências no ciclo das sucessivas retiradas cirúrgicas de fragmentos do aparelho genital, optamos por dar maior atenção à presença de espermatozóides no trânsito genital da fêmea.

Assim estabelecemos verificar, durante 4 anos, em duas fêmeas diferentes por vez, em dias alternados, a presença de espermatozóides no trato genital das mesmas, e a relação dessa presença com a transformação macroscópica do óvulo e sua localização, certos de que iríamos encontrar uma época do ano em que o número de serpentes com espermatozóides no trânsito genital nos desse



apoio para afirmar ter havido cópula espontânea, sendo portanto óbvio que deveria corresponder, essa época, com a do período de fecundidade da fêmea.

Usamos para este estudo fêmeas vivas provenientes de captura, recebidas no Instituto Butantan e outras por nós capturas nas proximidades de São Paulo.

Como método para exame retiramos por laparotomia mediana, ovários, úteros (oviductos) e vaginas, que eram abertos, com tesoura estéril, longitudinalmente.

Recolhíamos, por contato direto de lâmina para microscopia, o conteúdo de todo o interior da vagina e útero, indo pesquisar a presença de espermatozóides e o estado dos mesmos.

Ao mesmo tempo, exame do ovário era feito, tanto no sentido de procurar células sexuais femininas, quanto masculinas.

Para podermos ter uma idéia mais exata da possível sobrevida dos espermatozoides no trânsito genital feminino após cópula, coletamos esperma de machos vivos, por retirada cirúrgica de ambos os canais deferentes e expressão dos mesmos sôbre placa de plexiglas. Introduzimos este esperma sem diluição ou outro qualquer tratamento nas vaginas de fêmeas vivas, usando seringa e agulha equipada com um tubo de polietileno P — 90, de mais ou menos 5 cms de comprimento, com o fim de colocar o esperma certamente nos fundos de saco vaginais. Recolhemos diariamente por cateterismo com bastão de vidro adequado, a secreção vaginal e uterina de cada fêmea inseminada, para a pesquisa de espermatozóides vivos, controlando sua motilidade e duração da vitalidade.

Estudamos por este método 50 serpentes fêmeas, colocando em ambas as vaginas de cada uma o total de esperma retirado dos condutos espermáticos de cada um dos 50 machos vivos utilizados.

Depositados os espermatozóides, recolhíamos diariamente, parte do conteúdo das vaginas e úteros de cada fêmea em estudo, com auxílio de um bastão especial de vidro, para pesquisa do estado dos espermatozóides.

Ainda tínhamos a saber das possibilidades de existência na fêmea de *Crotalus* de receptáculo análogo ou não à espermateca de alguns insetos, que permitisse armazenar espermatozóides por períodos de tempo mais ou menos prolongados, sem alterações para os mesmos nas possíveis prenhezes periódicas desse animal.

Para tanto, examinamos o trânsito genital completo de 100 fêmeas adultas, com auxílio de microscópio estereoscópico, já que seriados histológicos seriam proibitivos, dado o tamanho de cada aparelho genital feminino (25 cm aproximadamente de comprimento de vagina a ovário e ainda em número de 2 em cada fêmea).

As técnicas utilizadas para estes procedimentos são objeto de trabalho em próxima publicação.

O material usado para este trabalho foi: Serpentes do gênero *Crotalus* (*C. d. terrificus* e *C. d. collelineatus*) adultos com peso médio de 400 gramas (máximo de 700 e mínimo de 350 gramas), todas procedentes do Estado de São Paulo.

O período de estudo foi de janeiro de 1967 a Dezembro de 1970. Usamos um total de 1522 fêmeas e 50 machos.

RESULTADOS

Introduzido o esperma, por injeção, no trânsito genital de 50 serpentes, usando 1 cada 3 dias, por espaço de pouco mais de um ano, verificamos na colheita diária de conteúdo de vaginas e úteros, a presença de espermatozóides vivos e com motilidade desde um mínimo de 5 dias após o depósito do esperma até um máximo de 59 dias, dando-se esta presença da seguinte forma:

De 1 a 10 dias: abundantes espermatozóides com motilidade normal, todos vivos.

De 11 a 20 dias: grande número de espermatozóides com motilidade normal, outros com motilidade diminuída, mas todos vivos.

De 21 a 30 dias: boa motilidade de 50% dos espermatozóides vistos por campo e o restante totalmente imóvel, mas íntegro.

De 31 a 50 dias: queda acentuada do número de espermatozóides, da sua vitalidade e motilidade, encontrando-se muitos restos de espermatozóides em fase de desintegração. Apenas uma serpente apresentou espermatozóides vivos após 60 dias, se bem que em número muito pequeno e motilidade quase nula.

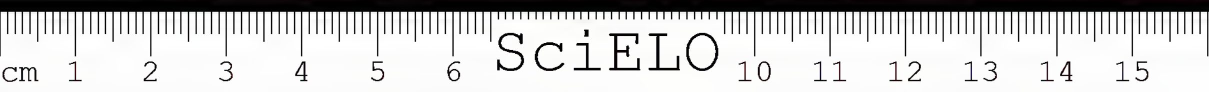
Examinados detalhadamente, com auxílio de microscópio estereoscópico, 100 úteros e 100 vaginas correspondentes a 50 serpentes adultas, durante um espaço de 12 meses consecutivos, não encontramos receptáculos, prega ou lugar que, a nosso ver, permitisse a estocagem de espermatozóides. A presença dos mesmos, quando achados, quer em serpentes por nós inseminadas, quer nas vindas de liberdade por captura, eram encontrados sempre disseminados através do útero, em toda a extensão deste, podendo ter agrupamento de maior população, tanto na raiz da vagina, quanto em qualquer ponto dos 25 cms aproximados de comprimento de cada útero.

Estes achados nas fêmeas, vindas por captura, eram sempre bilaterais, isto é, davam-se todas as vezes nos 2 úteros e em intensidade semelhante.

A existência de espermatozóides no trato genital feminino foi comprovada, a partir de maio aumentando em junho, julho e agosto, diminuindo em setembro, outubro, e desaparecendo totalmente na primeira quinzena de novembro.

Simultaneamente encontramos a partir de julho, migração do óvulo do ovário para o útero. Não raro encontramos serpentes prenhes ainda com espermatozóides vivos na vagina.

Verificamos que, durante os quatro anos consecutivos que pesquisamos a presença de espermatozóides, os resultados de cada ano praticamente se superpunham.



Apresentamos a seguir uma tabela do resultado médio geral, durante os 4 anos.

Nesta tabela, constam além das épocas de presença dos espermatozóides no aparelho genital da fêmea, os meses do ano em que encontramos serpentes prenhes.

DISCUSSÃO

Na farta literatura pertinente, encontramos as mais diversas e contraditórias opiniões, quer no que se refere às possibilidades de estocagem de espermatozóides, quer nas possíveis épocas de reprodução, nas diferentes espécies.

Wood, 1933 menciona acasalamento de fêmeas prenhes, durante o verão.

Saint-Girons (1952, 1957, 1966); Dottrens (1963); Duguy (1964) referem haver sempre um acasalamento na primavera e outro no outono, sendo férteis apenas os da primavera.

Belluomini e cols., (1966), num estudo citológico e ponderal do testículo de *C. d. terrificus*, realizado no período de um ano, afirmam haver maturidade sexual do macho dessa espécie no período de janeiro e maio, sendo de junho a setembro o período de repouso sexual.

Berry, e Lim, (1967) relata que, durante um ano de observação de exemplares de *Homolapsis buccata* de clima equatorial, não encontrou uma época fixa e definida de reprodução.

Osgood, 1969 refere-se sobre as influências climáticas no acasalamento de serpentes.

De um modo geral, todos esses autores relatam, de um modo lato, as épocas de acasalamento, sem definí-las exatamente, dando, muitas vezes, a entender que haveria grande influência das condições climáticas e ecológicas na época da reprodução.

Woodward, (1933); Haines, (1940); Kopstein, (1938); Rahn, (1940), e Blanchard e Blanchard, (1940), afirmam ser possível encontrar espermatozóides com motilidade e capacidade de fecundação normais, dentro do aparelho genital da fêmea, por longo período, após a cópula.

Sosnowsky, (1940) admite a possibilidade de atraso de fertilização, relatando um caso de fêmea de *Elaphe dione*, coletada em agosto de 1936 e que veio a colocar ovos férteis em maio de 1937.

Trapido, (1940) cita haver encontrado espermatozóides com motilidade normal no trânsito genital feminino, desde o outono, até a primavera seguinte.

Haines, (op. cit.) encontra estocagem de espermatozóides em *Leptodeira annulata* por espaço superior a 6 anos, pela observação da presença de ovos férteis nesse espaço de tempo.

Rahn aventa a possibilidade de a cascavel da pradaria manter espermatozóides vivos no trânsito genital feminino, que sobreviveriam durante todo o inverno.

O mesmo autor, (1942), relata ter encontrado espermatozóides confinados somente na porção posterior do útero, em fêmeas, após longo espaço da cópula.

Rahn (1942) também parece encontrar uma correlação entre a presença de espermatozóides no trânsito genital feminino e a fase do ciclo ovariano do mesmo.

Carson (1945) observou a postura de ovos fecundados, após 4 anos e 4 meses de cativeiro, sem presença de macho, de um exemplar fêmea de *Drymarchon corais*.

Darevsky (1971) admite também, a possibilidade de estocagem de espermatozóides no trânsito genital feminino, por observação de um exemplar fêmea de *Xenodon merremii* que durante 2 anos e 10 meses, em cativeiro, sem contacto com macho, depositou ovos fecundados.

Klauber (1956) dedica em seu livro Rattlesnakes, um capítulo a comentários sobre a reprodução da cascavel norte-americana.

Todos esses autores relatam fatos por eles observados, sendo concordantes no fato da possibilidade de existência de armazenamento de espermatozóides no trânsito genital feminino de serpentes ovíparas que permitiria posturas sucessivas de ovos fecundados, e que, nas serpentes vivíparas, haveria possibilidade de sobrevida longa desses espermatozóides.

Com relação à época de maturidade sexual dos machos do gênero *Crotalus*, referida no trabalho de Belluomini e cols., op. cit., que é baseada no peso ponderal do testículo, notamos anteceder essa época ao período de fecundidade das fêmeas, por nós encontrado. Essa antecipação poderia ser explicada como um preparo sexual prévio do macho que, carecendo de vesícula seminal, reteria o esperma no ducto espermático e possivelmente no próprio testículo.

Com a entrada da fêmea na época propícia à cópula, os ductos espermáticos seriam esvaziados, por coito, dando vazão ao conteúdo testicular, com conqüente diminuição de seu peso, coincidindo esses achados com o início do cio das fêmeas.

CONCLUSÃO

Baseados em nossos achados, podemos afirmar não haver aparente possibilidade anatômica de estocagem de espermatozóides por períodos superiores a 60 dias, no aparelho genital da fêmea de *Crotalus* do Estado de São Paulo, se bem que os mesmos tenham sobrevivido até 59 dias, com motilidade normal, quando introduzidos artificialmente nas mesmas.

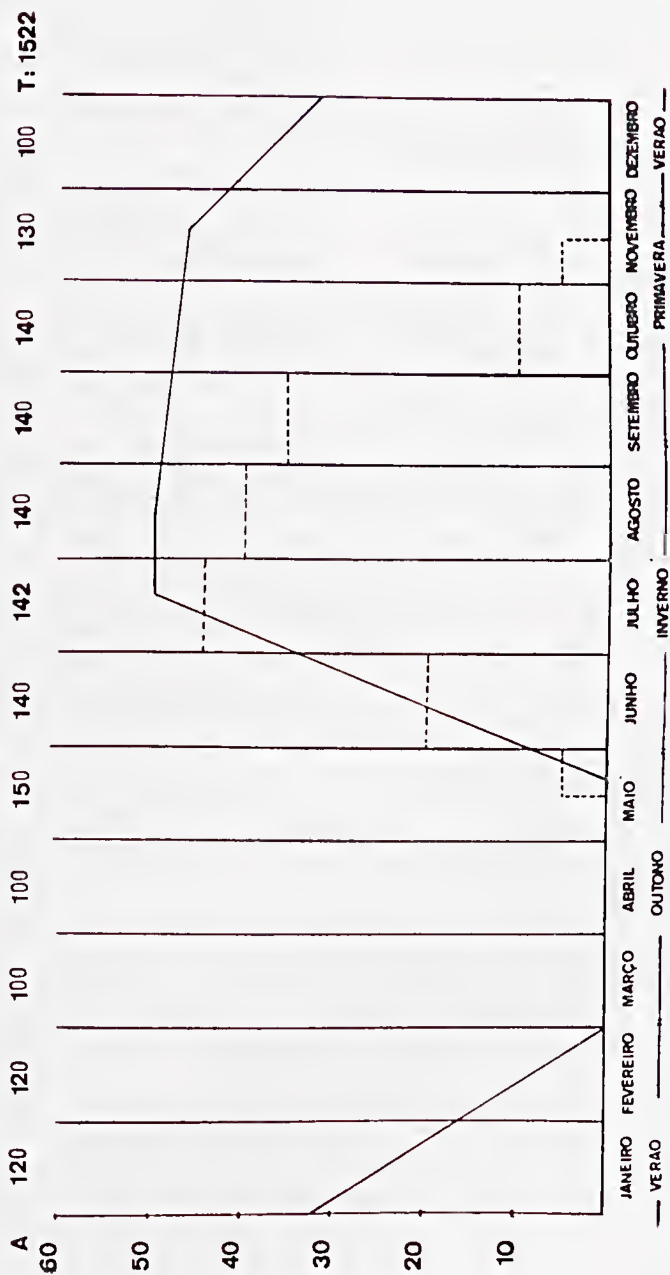
Por outro lado, parece-nos poder fixar a época de fertilidade das fêmeas de *Crotalus* do Estado de São Paulo, como sendo entre os meses de maio a agôsto.

A presença de espermatozóides até o mes de outubro, apresentada em nossas tabelas, é explicada apenas como sendo a sobrevida desses no trato genital feminino, após a cópula.



DETERMINAÇÃO DA ÉPOCA DE FECUNDIDADE EM FÊMEAS DO GENERO CROTALUS

Numero de exemplares estudados por mes e estação do ano de acordo com a presença de espermatozoides e prenhezes encontrados no transito genital de serpentes do genero Crotalus do Estado de São Paulo durante os anos de 1967, 1968, 1969 e 1970



A NÚMERO DE EXEMPLARES PESQUISADOS

--- PERCENTAGEM DE FÊMEAS COM ESPERMATOZÓIDES

— SERPENTES FECUNDADAS

LANGLADA, F. G. DE, FERREIRA GONÇALVES, M. & RODRIGUES, E. T. — Determinação da época de fecundidade em fêmeas do gênero *Crotalus*.
Mem. Inst. Butantan, 37: 253-260, 1973.

SUMMARY — The AA. study the fecundity period in snakes of the genus *Crotalus* in the State of São Paulo.

To this purpose they investigated the presence of spermatozoa in the genital tract of 1522 females, soon after capture and during a period of 4 years, correlating the presence of these spermatozoa with the fecundity period.

Simultaneously the survival time of spermatozoa artificially inoculated in 50 females was analyzed.

Anatomic examinations were also made with a view to finding a spermatheca or some similar place in the genital tract of the *Crotalus* female.

The average survival time of the spermatozoa was established, no anatomic conditions for storage of the same having been found. The period favorable for fecundation is given as between the months of May and October.

UNITERMS — Fecundity period and survival of spermatozoa in the genital tract of female Brazilian snakes of the genus *Crotalus*.

BIBLIOGRAFIA

1. BELLUOMINI, H. E; FRANCO DE MELLO, R.; PENHA, A. M. & SCHREIBER, G. — Estudo citológico e ponderal do testículo de *Crotalus durissus terrificus* durante o ciclo reprodutivo anual. *Mem. Inst. Butantan*, Simp. Internac. 33(3), 761-766, 1966.
2. BERRY, P. Y. & LIM, G. S. — The breeding pattern of the puff-faced water snake, *Homalopsis bueeata* Boulenger. *Copeia*, 2: 307-313, 1967.
3. BLANCHARD, F. N. & BLANCHARD, F. C. — Factors determining time of birth in the gartersnake *Tham nophis sirtalis sirtalis* (Linnaeus). *Pap. Mich. Acad. Sei , Arts and Let.*, 26: 161-176, 1940.
4. CARSON, H. L. — Delayed fertilization in a captive indigo snake with notes on feeding and shedding. *Copeia*, 4: 222-225, 1945.
5. DAREVSKY, I. S. — Delayed fertilization in the Brazilian colubrid snake *Xenodon merremii* (Wagler). *Journal of Heretology*, 5: 1 2, 82-83, 1971.
6. DOTTRENS, E. — Batraciens et reptiles d'Euroe. *Delaehaux et Nicstlé-Neuchâtel*, 261, 1963.
7. DUGUY, R. — Biologie des vipères de Vendée. *Science et Nature*, 61: 11-15, 1964.
8. HAINES, T. P. — Delayed fertilization in *Leptodeira annulata polystieta*. *Copeia*, 3: 116-118, 1940.
9. KLAUBER, L. M. — Rattlesnakes. University of California Press, 2 vols., pp. xxix + 708; xvii + 1476. 1956.
10. KOPSTEIN, F. — Ein Beitrag zur Eierkunde und Fortpflanzung der Malaiischen Reptilien. *Bull. Raffles Mus.*, 14, 81-167, 1938.
11. OSGOOD, D. W. — The effect of temperature in the breeding of snakes. *Diss. Abstr. Bull.*, 29:9, 3547-3548, 1969.
12. RAHN, H. — Sperm viability in the uterus of gartersnake, *Thamnophis*. *Copeia*, 2, 109-115, 1940.
13. RAHN, H. — The reproductive cycle of the prairie rattler. *Copeia*, 4, 233-240, 1942.
14. SAINT-GIRONS, H. — Ecologie et éthologie des vipères de France. *Ann. Sc. Nat. Zool.*, 14, 263-343, 1952.
15. Saint-Girons, H. — Le cycle sexuel chez *Vipera aspis* (L.) dans l'Ouest de la France. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 91(3), 284-350, 1957.
16. SAINT-GIRONS, H. — Le cycle sexuel des serpents venimeux. *Mem. Inst. Butantan*, Simp. Internac. 33(1), 105-114, 1966.
17. SOSNOWSKY, J. P. — Breeding biology of *Elaphe dione* (Pall). *Trans. Moseow Zoo*, *I*, 169-173, 1940.
18. TRAPIDO, H. — Mating time and sperm viability in *Storeria*. *II*, 107-109 1940.
19. WOOD, F. D. — Mating of the pairie rattlesnake *Crotalus eonfluentus eonfluentus Say*. *Ibid*, 3, 84-87, 1933.
20. WOODWARD, S. F. — A few notes on the persistence of active spermatozoa in the African night adder, *Causus rhombeatus*. *Proc. Zool. Soc. London*, I. 189-190, 1933.

Recebido para publicação em 10.VIII.73.
Aceito para publicação em 18.IX.73.



Mem. Inst. Butantan
37: 261-290, 1973

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DAS SERPENTES DO ESTADO DE PERNAMBUCO

CARMEM L. CORDEIRO **
A. R. HOGE *

Seção de Herpetologia, Instituto Butantan

RESUMO — No presente trabalho foram registradas 28 espécies de serpentes não venenosas: 3 Boidae e 25 Colubridae: 5 espécies de serpentes venenosas marcando um total de 250 espécies.

UNITERMOS — Serpentes do Nordeste brasileiro.

Considerando que ainda há muitas lacunas no conhecimento da fauna ofiológica do Nordeste brasileiro, julgamos útil a publicação da presente lista, constando de tabelas.

MATERIAL:

Foram estudadas as seguintes coleções:

DEH = Depto. de Ecologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco.

IBH = Coleção de Ofídios da Seção de Herpetologia do Instituto Butantan.

MZUSP = Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

DISCUSSÃO

O número relativamente elevado de especimens examinado, permite uma melhor avaliação da distribuição geográfica, pois a maioria dos especimens provém de localidades onde a sua ocorrência das espécies não tinham sido constatada.

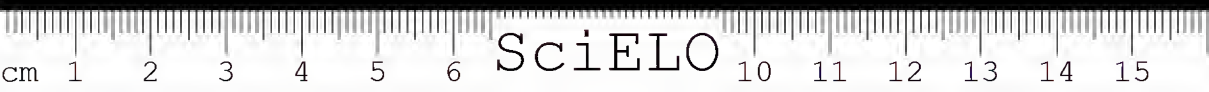
Ampliou-se também a distribuição geográfica conhecida para a espécie *mossoroensis* recentemente descrita.

Para um estudo mais pormenorizado da distribuição de acordo com as regiões fitogeográficas, ainda se necessitam de muito mais especimens.

* e ** Trabalho realizado com auxílio do CNPq e U.F.PE.

Endereço para correspondência:
C.P. 65, São Paulo, Brasil.

LISTA DAS ESPÉCIES



Boa constrictor constrictor Linnaeus

N.º coleção		Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH	543	Gaibu, PE	26/2/70	♀	79-89-55	241	1	47	22/24	27/28	27,7mm	442mm	52mm
IBH	31323	Recife, PE	29/7/70	♂	72-90-53	236	1	53	23/23	26/24	56,9mm	pele	155mm
IBH	275	— PE	?	♀	70-90-47	237	1	48	21/21	24/24	62,6mm	1590mm	173mm
IBH	22923	Recife, PE	22/3/69	♀	? -95- ?	240	1	56	21/20	24/26	27,1mm	465mm	60mm

Coralus enydris enydris (Linnaeus)

N.º coleção		Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH	282	Recife, PE	21/4/69	♂	47-52-26	267	1	111/111	14/13	16/16	19,6mm	440mm	112mm
IBH	277	Engenho Boa Ventura, PE	?	♀	45-57-27	263	1	110/ ?	14/13	18/18	42,5mm	1210mm	341mm

Epicrates cenchria assisi, Machado

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 610	Limoeiro, PE	3/6/70	♂	33-50-26	247	1	53	14/14	15/15	20,9mm	365mm	57mm
DEH 565	Buique, PE	26/3/70	♂	42-50-27	244	1	42	15/14	17/17	20,6mm	367mm	50mm
MZUSP 5005	Floresta, PE	28/6/71	♂	41-47-26	249	1	54	15/15	14/15	52,6mm	1255mm	154mm
MZUSP 5002	Carnaubeira, PE	24/5/71	♂	41-50-26	249	1	56	14/13	16/16	41,1mm	1000mm	141mm

Apostolepis cearensis Gomes

DEH 652	João Pessoa, PA	10/11/70	♀	16-15-15	237	1/1	26/26	6/6	7/7	7,7mm	200mm	18mm

Clelia occipitolutea (Duméril, Bibron et Duméril)

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 371	Juazeiro do N., CE	2/10/69	♀	21-19-17	229	1	65/65	8/8	8/8	53,0mm	1550mm	311mm
MZUSP 4982	Carnaubeira, PE	22/ 5/71	♂	21-19-17	217	1	66/66+5	7/7	8/8	44,8mm	1210mm	252mm
MZUSP 4983	Carnaubeira, PE	22/ 5/71	♂	19-19-17	221	1	67/67+5	7/7	8/8	41,0mm	1210mm	246mm
MZUSP 4994	Carnaubeira, PE	22/ 5/71	♀	21-19-17	237	1	61/61+5	7/7	8/7	57 2mm	1735mm	267mm

Chironius carinatus (Linnaeus)

N.º coleção		Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Comprimentos Corpo	Comprimentos Cauda
DEH	255	Saltinho, PE	13/ 6/69	♂	14-12-8	102mutil.	1/1	122/122	?	?	?	785mm	417mm
DEH	290	PE	6/2/69	♂	14-12-8	157	1/1	79/79 cm	8/8	10/10	39,1mm	1094mm	401mm cm
DEH	524	Recife, PE	17/ 2/70	♀	14-12-10	155	1/1	109/109 cm	8/9	10/10	35,4mm	840mm	404mm cm
DEH	490	Cabrobó, PE	5/10/69	♀	14-12-8	158	1/1	115/115 cm	8/8	11/10	33,8mm	850mm	432mm cm
MZUSP	4948	Agrestina, PE	18/ 5/71	♂	14-12-8	134	1/1	127/127 cm	9/9	10/9	23,4mm	420mm	268mm cm
IBH	17296	Recife, PE	16/12/57	♀	14-12-8	155	1/1	107/107 cm	8/8	10/10	35,2mm	910mm	429mm cm
IBH	17342	Recife, PE	28/ 1/58	♂	14-12-8	152	1/1	41/41 cm	8/8	10/11	38,7mm	985mm	290mm cm
IBH	17343	Recife, PE	28/ 1/58	♂	14-12-8	155	1	123/123 cm	8/8	10/10	41,0mm	1015mm	528mm cm
IBH	17299	Recife, PE	16/12/57	♂	14-12-8	153	1/1	77/77 cm	8/8	10/11	41,0mm	1060mm	385mm cm
IBH	17298	Recife, PE	16/12/57	♂	14-12-8	149	1/1	85/85 cm	8/8	10/9	37,7mm	950mm	390mm cm
IBH	17295	Recife, PE	16/12/57	♂	14-12-8	154	1/1	23/23 cm	8/8	10/10	39,0mm	1005mm	140mm cm
IBH	17297	Recife, PE	16/12/57	♀	14-12-8	155	1/1	78/78 cm	8/9	10/11	36,5mm	912mm	340mm cm
IBH	17344	Recife, PE	28/ 1/58	♀	14-12-8	156	1/1	49/49 cm	8/8	10/10	37,5mm	948mm	227mm cm
IBH	17206	Recife, PE	3/ 9/57	♂	14-12-8	153	1/1	128/128	8/8	10/10	44,2mm	1103mm	555mm

cm = cauda mutilada.

Chironius flavolineatus (Boettger)

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 521	Camaragibe, PE	25/ 1/70	♀	14-12-10	156	1/1	123/123 cm	9/9	10/9	23,3mm	686mm	407mm cm
DEH 609	Limoeiro, PE	3/ 6/70	♀	13-12-10	157	1/1	133/133 cm	9/9	10/10	23,2mm	635mm	400mm cm
DEH 104	São Lourenço da Mata, PE	11/ 9/69	♀	14-12-10	155	1/1	117/117	9/9	10/10	19,9mm	550mm	323mm cm
IBH 17300	Recife, PE	16/12/57	♀	12-12-10	157	1/1	119/119 cm	9/9	10/10	20,5mm	577mm	327mm cm
IBH 28618	Recife, PE	4/ 6/68	♂	12-12-8	156	1/1	142/142	9/10	10/10	21,5mm	570mm	372mm

Dipsas neivai Amaral

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 644	Gravatá, PE	7/12/70	♀	17-15-15	185	1	75/75	8/8	11/11	15,0mm	364mm	100mm
DEH 371	Juazeiro do N., CE	2/10/69	♀	21-19-17	229	1	65/65 cm	8/8	8/8	53,0mm	1550mm	311mm cm

cm = cauda mutilada.

Drymarchon corais corais (Boie)

N.º coleção		Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Comprimentos Corpo	Comprimentos Cauda
DEH	301	Vieência, PE	13/3/69	♂	19-17-15	200	1/1	75/75	8/8	8/8	58,4mm	1553mm	331mm

Helicops angulatus (Linnaeus)

N.º coleção		Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Comprimentos Corpo	Comprimentos Cauda
DEH	760	Bonji, PE	20/7/71	♂	21-19-17	118	1/1	96/96	8/8	10/9	22,5mm	362mm	232mm
DEH	61	PE	15/9/69	♂	21-19-17	120	1/1	101/101	8/	10/11	16,9mm	270mm	160mm

CORDEIRO, C. L. & HOGE, A. R. — Contribuição ao conhecimento das serpentes do Estado de Pernambuco.
Mem. Inst. Butantan, 37: 261-290, 1973.

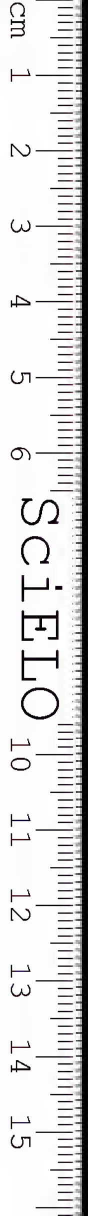
Helicops leopardinus (Schlegel)

N.º coleção		Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH	445	Juazeiro do N., CE	4/10/69	♀	19-19-17	123	1/1	63/63	8/8	10/10	32,0mm	523mm	185mm
DEH	247	Bonjí, PE	13/8/69	♀	21-19-17	124	1/1	15/15 cm	8/8	10/10	24,7mm	406mm	33mm cm
DEH	250	Recife, PE	13/3/69	♀	21-19-17	128	1/1	59/59	8/8	11/10	33,0mm	455mm	143mm
DEH	137	Bonjí, PE	2/9/69	♂	21-19-17	123	1/1	74/74	8/8	10/10	17,6mm	285mm	130mm
DEH	148	Recife, PE	13/9/69	♂	21-19-17	125	1/1	77/77	8/7	9/9	17,5mm	176mm	71mm
DEH	351	Recife, PE	25/9/69	♀	21-19-17	126	1/1	60/60	8/8	11/10	24,5mm	380mm	119mm
DEH	514	Recife, PE	22/12/69	♀	21-19-17	131	1/1	62/62	8/8	10/10	22,6mm	415mm	133mm
DEH	251	Recife, PE	13/3/69	♀	21-19-17	126+1	1/1	60/60	8/8	10/10	31,0mm	526mm	149mm
DEH	158	Recife, PE	15/9/69	♂	21-19-17	125+1	1/1	47/47 cm	8/8	10/9	19,2mm	345mm	100mm cm
DEH	252	PE	13/3/69	♂	19-19-17	123	1/1	76/76	8/8	10/10	19,5mm	357mm	169mm

cm = cauda mutilada.

Dromicus almadensis (Wagler)

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 759	Bonjí, PE	20/ 7/71	♀	19-19-17	154	1/1	65/65	8/8	10/10	19,9mm	390mm	112mm
DEH 757	Bonjí, PE	10/ 5/71	♀	19-19-17	149	1/1	61/61	8/8	10/10	26,6mm	430mm	116mm
DEH 221	Camaragibe, PE	21/ 9/69	♀	19-19-17	148	1/1	66/66	8/8	10/10	16,6mm	370mm	110mm
DEH 536	Recife, PE	24/ 2/70	♀	19-19-17	147	1/1	58/58	8/8	10/10	18,6mm	390mm	109mm
DEH 258	Bonjí, PE	28/ 7/69	♀	19-19-17	151	1/1	61/61	8/8	10/10	17,0mm	367mm	92mm
DEH 102	S. Lour. da M.,	11/ 9/69	♀	19-19-17	149	1/1	67/67	8/?	10/10	?	375mm	89mm
DEH 512	PE	24/11/69	♀	19-19-17	147	1/1	64/64	8/8	10/10	10,1mm	145mm	42mm
DEH 623	Recife, PE	27/ 7/70	♀	19-19-17	154	1/1	65/65	8/8	10/10	8,9mm	112mm	34mm
DEH 155	Recife, PE	13/ 9/69	♂	19-19-17	148	1/1	62/62	8/8	10/10	15,0mm	320mm	97mm
DEH 134	Recife, PE	16/ 9/69	♂	19-19-17	149	1/1	65/65	8/8	9/9	24,3mm	340mm	111mm



Dromicus poecilogyrus xerophilus (Amaral)

N.º coleção		Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Comprimentos Corpo	Comprimentos Cauda
DEH	606	Limociro, PE	18/ 5/70	♀	19-19-15	153	1/1	51/51	8/8	11/11	22,8mm	528mm	111mm
DEH	553	Triunfo, PE	26/ 3/70	♀	19-19-15	150	1/1	54/54	8/8	11/11	15,8mm	185mm	40mm
DEH	755	Bonjí, PE	10/ 5/71	♀	19-19-15	151	1/1	47/47	8/8	10/10	13,4mm	204mm	39mm
DEH	654	Recife, PE	24/11/70	♀	19-19-15	150	1/1	48/48	8/8	9/9	21,0mm	410mm	83mm
DEH	525	Recife, PE	16/ 2/70	♀	19-19-15	144	1/1	49/49	8/8	10/10	23,1mm	440mm	102mm
DEH	616	Bonjí PE	11/ 6/70	♀	19-19-15	151	1/1	44/44cm	8/8	10/9	21,8mm	430mm	82mm cm
DEH	515	Recife, PE	30/12/69	♀	19-19-15	147	1/1	44/44	7/8	9/10	15,8mm	468mm	54mm
DEH	544	Recife, PE	16/ 3/70	♀	19-19-15	145	1/1	50/50	8/8	9/8	12,9mm	183mm	38mm
DEH	639	Recife, PE	31/ 7/70	♀	19-19-15	148	1/1	51/51	8/8	9/9	13,5mm	193mm	41mm
DEH	653	Recife, PE	24/11/70	♀	19-19-15	157	1/1	47/47	8/8	9/9	?	225mm	42mm
DEH	523	Recife, PE	12/ 2/70	♀	19-19-15	154	1/1	52/52	8/8	10/10	10,2mm	125mm	26mm
DEH	758	Recife, PE	10/ 5/71	♂	19-19-15	148	1/1	39/39+10	8/8	11/11	16,7mm	263mm	53mm

cm = cauda mutilada.

Dromicus poecilogyrus xerophilus (Amaral) continuação

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 756	Bonji, PE	10/ 5/71	♂	19-19-15	151	1/1	48/48	8/8	11/11	10,6mm	156mm	30mm
DEH 520	Recife, PE	25/ 1/70	♂	19-19-15	148	1/1	49/49	8/8	10/10	17,2mm	295mm	64mm
DEH 522	Recife, PE	2/ 2/70	♂	19-19-15	147	1/1	49/49	8/8	10/10	12,1mm	155mm	31mm
DEH 615	Limoeiro, PE	3/ 6/70	♂	19-19-15	152	1/1	48/48	8/8	9/10	12,8mm	171mm	33mm
DEH 560	Triunfo, PE	26/ 3/70	♂	19-19-15	161	1/1	50/50	8/8	10/10	12,8mm	180mm	36mm
DEH 519	Recife, PE	25/ 1/70	♂	19-19-15	150	1/1	50/50	8/8	10/10	10,3mm	140mm	29mm
DEH 651	João P., PE	10/11/70	♂	19-19-15	153	1/1	52/52	8/8	10/10	11,5mm	?	36mm
DEH 592	Bonji, PE	24/ 4/70	♂	19-19-15	157	1/1	31/31 cm	8/8	10/10	13,3mm	196mm	23mm cm
MZUSP 4951	Agrestina, PE	18/ 5/71	♀	19-19-15	145	1/1	54/54	8/8	10/10	14,3mm	122mm	26mm
MZUSP 4972	Agrestina, PE	18/ 5/71	♀	21-19-15	149	1/1	49/49	8/8	10/10	32,2mm	545mm	107mm
IBH 17379	Recife, PE	20/ 4/58	♀	19-19-15	151	1/1	51/51 cm	8/8	9/9	31,8mm	675mm	142mm cm
IBH 17380	Recife, PE	20/ 4/58	?	19-19-15	144	1/1	47/47	8/8	10/10	11,3mm	150mm	31mm

cm = cauda mutilada.

CORDEIRO, C. L. & HOGE, A. R. — Contribuição ao conhecimento das serpentes do Estado de Fernambuco.
Mem. Inst. Butantan, 37: 261-290. 1973.

Dromicus viridis (Günther)

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos: Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 624	Recife, PE	11/7/70	♀	19-19-17	181	1/1	63/63	8/8	10/10	16,0mm	380mm	100mm
DEH 517	Recife, PE	12/1/70	♀	19-19-17	179	1/1	68/68	8/8	10/10	10,1mm	170mm	44mm
DEH 526	Recife, PE	23/2/70	♂	19-19-17	172	1/1	70/70	8/8	10/10	8,9mm	120mm	33mm
MZUSP 4965	Agrestina, PE	18/5/71	♂	19-19-17	177	1/1	72/72	8/8	11/11	13,1mm	304mm	90mm
MZUSP 4942	Agrestina, PE	18/5/71	♂	19-19-17	177	1/1	73/73	8/8	10/10	20,6mm	350mm	109mm
MZUSP 4970	Agrestina, PE	18/5/71	♀	19-19-17	175	1/1	71/71	8/8	10/10	14,8mm	300mm	87mm
MZUSP 4946	Agrestina, PE	18/5/71	♀	19-19-17	176	1/1	65/65	8/8	10/10	14,4mm	313mm	84mm
MZUSP 4925	Agrestina, PE	15/5/71	♂	19-19-17	180	1/1	?	8/8	11/11	20,8mm	339mm	?

Leptotyphlops brasiliensis Laurent

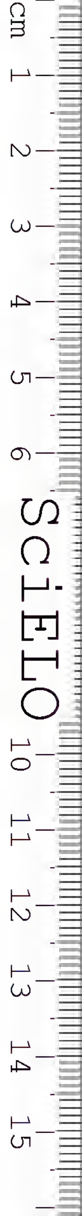
N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos: Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 608	Sertânia, PE	20/5/70	♀	14	246	1	14	4/4	5/5	2,0mm	125mm	5,0mm

Liophis cobella (Linnaeus)

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 528	Recife, PE	24/ 2/70	♀	17-17-15	153	1/1	52/52	8/8	10/9	10,4mm	175mm	38mm
DEH 650	Recife, PE	10/11/70	♀	17-17-15	152	1/1	52/52	8/8	10/10	25,3mm	640mm	123mm

Liophis mossoroensis Hoge e Lima-Verde

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 614	Limoeiro, PE	3/6/70	♀	17-17-15	152	1/1	50/50	8/8	9/9	16,3mm	299mm	63mm
DEH 659	Petrolina, PE	19/4/71	♀	17-17-15	160	1/1	52/52	8/8	10/10	13,4mm	312mm	56mm
MZUSP 4929	Agrestina, PE	18/5/71	♀	17-17-15	143	1/1	53/53	8/8	10/10	11,4mm	165mm	39mm
MZUSP 4953	Agrestina, PE	18/5/71	♀	17-17-15	143	1/1	50/50	8/8	9/10	11,3mm	185mm	42mm
MZUSP 4952	Agrestina, PE	18/5/71	♀	17-17-15	145	1/1	50/50	8/8	10/10	12,7mm	237mm	52mm



Mastigodryas bifossatus triseriatus (Amaral)

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 458	Recife, PE	24/9/69	♀	19-15-15	174	1/1	101/101	7/9	10/9	51,4mm	1.265mm	463mm

Oxybelis aeneus (Wagler)

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Cauda	Corpo
DEH 562	Triunfo, PE	26/3/70	♀	17-17-13	197	1/1	161/161	9/9	8/9	31,0mm	904mm	582mm

Oxyrhopus rhombifer rhombifer Duméril, Bibron et Duméril

N.º coleção		Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH	643	Garanhuns, PE	24/8/70	♂	21-19-17	181	1	74/74	9/8	10/10	19,7mm	480mm	137mm
DEH	80	Barbalha, CE	20/7/58	♀	21-19-17	192	1	56/56	8/8	10/10	11,7mm	248mm	48mm
DEH	162	Garanhuns, PE	20/9/69	♀	21-19-17	187	1	60/60	8/8	9/9	22,6mm	595mm	126mm

Oxyrhopus trigeminus Duméril, Bibron et Duméril

N.º coleção		Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH	85	Recife, Pe	19/7/58	♂	21-19-17	183	1	68/68	8/8	10/9	15,8mm	380mm	95mm
DEH	65	Recife, Pe	15/9/69	♂	21-19-17	182	1	78/78	8/8	10/10	17,5mm	431mm	128mm
DEH	390	Triunfo, PE	29/9/69	♂	19-19-17	184	1	65/65	8/8	10/10	20,3mm	512mm	122mm
DEH	197	Garanhuns, PE	19/9/69	♂	19-19-17	183	1	67/67	8/8	10/11	15,3mm	400mm	100mm
DEH	199	Garanhuns, PE	19/9/69	♀	19-19-17	192	1	33/33 cm	8/8	9/9	16,2mm	470mm	58mm cm
DEH	151	Recife, PE	13/9/69	♂	19-19-17	178	1	75/75	8/8	10/10	16,8mm	355mm	103mm
DEH	193	Garanhuns, PE	19/9/69	♂	21-19-17	175	1	72/72	8/8	9/9	14,7mm	320mm	95mm
DEH	194	Garanhuns, PE	19/9/69	♂	? 19-17	177	1	70/70	8/8	10/10	15,6mm	310mm	85mm
DEH	150	Recife, PE	13/9/69	♂	21-19-17	183	1	72/72	7/7	9/9	15,2mm	357mm	99mm
DEH	394	Triunfo, PE	29/9/69	♂	21-19-17	184	1	71/71	8/9	11/11	13,4mm	308mm	86mm
DEH	198	Garanhuns, PE	19/9/69	♂	21-19-17	178	1	64/64	8/8	10/10	11,1mm	227mm	53mm
DEH	179	Garanhuns, PE	20/9/69	♂	19-19-17	183	1	69/69	8/8	10/10	10,1	228mm	55mm
DEH	604	Toritama, PE	13/5/70	♂	19-19-17	183	1	69/69	8/9	10/10	?	172mm	43mm

cm = cauda mutilada.

CORDEIRO, C. L. & HOGE, A. R. — Contribuição ao conhecimento das serpentes do Estad[o]
de Pernambuco.
Mem. Inst. Butantan, 37: 261-290, 1973.

Oxyrhopus trigeminus Duméril, Bibron et Duméril (continuação)

N.º coleção		Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH	165	Garanhuns, PE	20/9/69	♂	19-19-17	181	1	71/71	8/8	9/9	8,5mm	156mm	32mm
DEH	107	PE	15/9/69	♂	19-19-17	182	1	67/67	8/8	9/9	11,7mm	245mm	61mm
DEH	163	Garanhuns, PE	20/9/69	♀	21-19-17	185	1	60/60	8/8	9/9	18,4mm	480mm	107mm
DEH	121	Recife, Pe	15/9/69	♀	19-19-17	197	1	62/62	8/8	9/9	16,2mm	415mm	88mm
								cm					cm
DEH	26	PE	5/1/69	♀	19-19-17	191	1	60/60	8/8	9/9	24,6mm	560mm	114mm
DEH	591	Triunfo, PE	27/3/70	♀	19-19-17	203	1	56/56	?	?	?	580mm	112mm
DEH	183	Garanhuns, PE	20/9/69	♀	19-19-17	194	1	61/61	8/8	9/9	18,3mm	430mm	97mm
DEH	21	Recife, Pe	6/3/63	♀	21-19-17	189	1	60/60	8/8	9/9	9,5mm	185mm	40mm
DEH	404	Triunfo, PE	29/9/69	♀	19-19-17	206	1	56/56	8/8	10/10	13,6mm	322mm	59mm
DEH	607	Toritama, PE	13/5/70	♀	21-19-17	190	1	58/58	8/8	10/10	12,6mm	301mm	57mm
								cm					cm
DEH	133	Recife, Pe	16/9/69	♀	19-19-17	186	1	62/62	?	?	8,8mm	151mm	30mm
DEH	228	Camaragibe, PE	18/9/69	♀	21-19-17	192	1	62/62	8/8	9/10	15,0mm	360mm	78mm

cm = cauda mutilada.

Pseudoboa nigra (Duméril, Bibron et Duméril)

N.º coleção		Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH	621	Recife, PE	11/ 6/70	♂	21-19-17	195	1	90	8/8	8/8	14,9mm	231mm	71mm
DEH	649	Rio Doce, PE	10/11/70	♀	21-19-17	204	1	82	8/8	8/8	26,0mm	743mm	206mm
DEH	589	Recife, PE	8/ 4/70	♂	21-19-17	196	1	66 cm	8/8	8/8	27 5mm	870mm	237mm cm
DEH	508	Recife, PE	15/10/69	♀	21-19-17	213	1	81	8/8	8/8	30,1mm	888mm	222mm
DEH	637	Recife, PE	5/ 8/70	♀	21-19-17	207	1	83	8/8	8/8	21,0mm	630mm	170mm
DEH	605	Toritama, PE	13/ 5/70	♀	21-19-17	210	1	85	8/8	8/8	16 5mm	430mm	123mm
MZUSP	4949	Agrestina, PE	18/ 5/71	♀	21-19-17	204	1	50	8/8	8/8	30,4mm	937mm	222mm

cm = cauda mutilada.

Philodryas nattereri Steindachner

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Cauda	Corpo
DEH 491	Cabrobó, PE	5/10/69	♂	23-21-17	207	1/1	127/127	8/8	11/12	32,8mm	880mm	411mm
MZUSP 4973	Agrestina, PE	18/ 5/71	♀	23-21-17	205	1/1	85/85	8/8	11/11	38,8mm	1060mm	325mm
MZUSP 4975	Agrestina, PE	18/ 5/71	♀	23-21-17	206	1/1	110/110	8/8	11/11	31,4mm	655mm	250mm
MZUSP 4974	Agrestina, PE	18/ 5/71	♂	23-21-17	205	1/1	106/106	8/8	11/11	32,6mm	968mm	362mm
MZUSP 4992	Carnubeira, PE	23/ 5/71	♂	23-21-17	207	1/1	65/65 cm	8/8	11/11	36,9mm	895mm	225mm cm
MZUSP 4993	Carnubeira, PE	23/ 5/71	♀	23-21-17	209	1/1	118/118	8/8	10/11	36,0mm	1000mm	382mm
MZUSP 4991	Carnubeira, PE	23/ 5/71	♀	23-21-17	208	1/1	24/24 cm	8/8	10/10	42,8mm	1185mm	105mm cm
MZUSP 4981	Carnubeira, PE	22/ 5/71	♀	23-21-17	206	1/1	113/113	8/8	11/11	39,0mm	840mm	320mm
MZUSP 5000	Carnubeira, PE	24/ 5/71	♀	23-21-17	209	1/1	114/114	8/8	11/11	25,8mm	665mm	249mm
MZUSP 4988	Carnubeira, PE	23/ 5/71	♀	23-21-17	209	1/1	111/111	8/8	11/11	24,1mm	595mm	231mm
MZUSP 4986	Carnubeira, PE	23/ 5/71	♂	23-21-17	204	1/1	129/129	8/8	11/11	23,5mm	580mm	271mm
MZUSP 4987	Carnubeira, PE	23/ 5/71	♂	23-21-17	206	1/1	125/125	8/8	11/11	26,7mm	694mm	331mm
MZUSP 4989	Carnubeira, PE	23/ 5/71	♀	23-21-17	214	1/1	117/117	8/8	11/11	22,2mm	577mm	216mm
MZUSP 4990	Carnubeira, PE	23/ 5/71	♀	23-21-17	211	1/1	115/115	8/8	11/11	26,8mm	515mm	193mm
IBH 1250	Pesqueira, PE	?/12/16	♀	21-21-17	208	1/1	107/107	8/8	10/11	16,5mm	285mm	95mm
IBH 1249	Pesqueira, PE	?/12/16	?	21-21-17	214	1/1	122/122	8/8	11/11	15,7mm	285mm	100mm
IBH 1200	Pesqueira, PE	?/12/17	♂	21-21-17	208	1/1	125/125	8/8	11/11	15,4mm	255mm	95mm
IBH 1299	Pesqueira, PE	?/12/17	♂	21-21-17	208	1/1	131/131	8/8	11/11	15,1mm	275mm	105mm

cm = cauda mutilada.

Philodryas olfersii (Lichtenstein)

N.º coleção		Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Comprimentos Corpo	Comprimentos Cauda
DEH	754	Bonjí, PE	19/ 5/71	♀	19-19-15	193	1/1	104/104	8/8	10/10	27,9mm	770mm	303mm
DEH	326	Bonjí, PE	19/ 6/68	♀	19-19-15	194	1/1	106/106	8/8	10/10	24,7mm	715mm	280mm
DEH	558	Triunfo, PE	27/ 3/70	♀	19-19-15	198	1/1	114/114	8/8	10/10	17,2mm	310mm	121mm
DEH	660	PE	19/ 4/71	♀	19-19-15	190	1/1	96/96	8/8	10/10	16,4mm	385mm	132mm
DEH	310	Recife, PE	17/ 9/69	♀	21-19-15	201	1/1	100/100	8/8	10/10	28,2mm	735mm	263mm
DEH	656	Recife, PE	7/12/70	♀	19-19-15	190	1/1	100/100	7/7	9/9	24,1mm	633mm	242mm
DEH	611	Limoeiro, PE	3/ 6/70	♀	19-19-15	196	1/1	106/106	8/8	10/10	26,7mm	830mm	315mm
DEH	34	PE	14/ 9/69	♀	19-19-15	192	1/1	107/107	8/8	10/10	26,5mm	720mm	278mm
DEH	175	Garanhuns PE	20/ 9/69	♀	19-19-15	195	1/1	103/103	7/7	11/11	27,8mm	705mm	267mm
								cm					cm
DEH	81	Barbalha CE	15/ 9/69	♀	19-19-15	192	1/1	105/105	7/7	10/10	30,5mm	720mm	290mm
								cm					cm
DEH	620	Recife, PE	27/ 6/70	♂	19-19-15	188	1/1	119/119	8/8	10/10	21,6mm	555mm	262mm
DEH	174	Garanhuns, PE	20/ 9/69	♂	19-19-15	183	1/1	116/116	8/8	10/10	23,8mm	578mm	255mm
DEH	327	Bonjí, PE	3/ 9/68	♂	21-19-15	178	1/1	116/116	8/8	10/10	22,8mm	535mm	247mm
DEH	507	Recife, PE	3/11/69	♂	21-19-15	178	1/1	113/113	8/8	10/10	21,7mm	503mm	240mm
DEH	370	Serra do Araripe, CE	2/10/69	♂	21-19-15	190	1/1	110/110	8/8	10/10	24,0mm	645mm	262mm

cm = cauda mutilada.

ČORDEIRO, C. L. & HOGE, A. R. — Contribuição ao conhecimento das serpentes do Estado de Pernambuco.
Mem. Inst. Butantan, 37: 261-290, 1973.

Philodryas olfersii (Lichtenstein) continuação

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 210	Garanhuns, PE	19/ 9/69	♂	21-19-15	181	1/1	117/117	8/8	11/11	14,7mm	309mm	130mm
DEH 555	Triunfo, PE	26/ 3/70	♀	21-19-15	199	1/1	112/112	8/8	10/10	13,7mm	266mm	96mm
DEH 557	Triunfo, PE	24/ 3/70	♀	19-19-15	203	1/1	115/115	8/8	10/10	15,8mm	340mm	125mm
DEH 391	Triunfo, PE	29/ 9/69	♀	21-19-15	195	1/1	109/109	8/8	10/11	26,7mm	702mm	272mm
							cm					cm
DEH 559	Triunfo, PE	27/ 3/70	♀	21-19-15	200	1/1	107/107	8/8	10/10	15,7mm	304mm	110mm
DEH 556	Arco Verde, PE	24/ 3/70	♂	21-19-15	182	1/1	119/119	8/8	10/10	13,7mm	240mm	100mm
DEH 511	Jaboatão, PE	24/11/69	♂	19-19-15	173	1/1	111/111	8/8	10/9	13,1mm	191mm	80mm
DEH 503	Recife, PE	8/10/69	♂	21-19-15	182	1/1	114/114	8/8	10/10	21,3mm	522mm	227mm
DEH 230	Camaragibe, PE	13/ 9/69	♂	21-19-15	188	1/1	128/128	8/8	11/11	22 5mm	575mm	278mm
DEH 325	PE	13/ 5/69	♂	21-19-15	189	1/1	111/111	9/8	11/11	20,7mm	522mm	200mm
DEH 459	Exú, PE	1/10/69	♂	21-19-15	193	1/1	110/110	8/8	11/10	23,7mm	662mm	255mm
DEH 223	Camaragibe, PE	18/ 9/69	♂	21-19-15	185	1/1	112/112	8/8	10/10	20,4mm	450mm	202mm
DEH 329	Recife, PE	10/ 4/68	♂	21-19-15	186	1/1	113/113	8/8	11/11	20,4mm	505mm	206mm
MZUSP 4999	Carnaubeira PE	24/ 5/71	♂	21-19-15	190	1/1	112/112	8/8	10/10	23,0mm	575mm	242mm
MZUSP 4932	Agrestina PE	18/ 5/71	♂	21-19-15	187	1/1	116/116	8/8	11/11	28,7mm	551mm	228mm

cm = cauda mutilada.

Philodryas olfersii (Lichtenstein) continuação

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
MZUSP 4934	Agrestina, PE	18/5/71	♂	21-19-15	177	1/1	113/113	8/8	10/11	26,2mm	500mm	210mm
MZUSP 4935	Agrestina, PE	18/5/71	♂	21-19,15	183	1/1	106/106	8/8	10/10	26,7mm	488mm	192mm
MZUSP 4933	Agrestina, PE	18/5/71	♂	21-19-15	186	1/1	97/97 cm	8/8	10/10	22,5mm	397mm	145mm cm
MZUSP 4962	Agrestina, PE	18/5/71	♀	21-19-15	193	1/1	102/102	8/8	9/9	20,1mm	474mm	180mm
MZUSP 4969	Agrestina, PE	18/5/71	♀	19-19-15	197	1/1	108/103	8/8	10/10	23,1mm	558mm	212mm
MZUSP 4866	Agrestina, PE	18/5/71	♂	21-19-15	187	1/1	106/106	8/8	10/10	24,9mm	450mm	199mm
MZUSP 4963	Agrestina, PE	18/5/71	♂	21-19-15	186	1/1	114/114	8/8	9/9	24,6mm	462mm	195mm
MZUSP 4971	Agrestina, PE	18/5/71	♀	21-19-15	190	1/1	108/108	8/8	10/10	31,0mm	660mm	252mm
MZUSP 4964	Agrestina, PE	18/5/71	♂	21-19-15	188	1/1	108/108	8/8	9/9	21,0mm	500mm	198mm
MZUSP 4967	Agrestina, PE	18/5/71	♀	21-19-15	195	1/1	115/115	8/8	9/9	21,4mm	284mm	115mm
MZUSP 4968	Agrestina, PE	18/5/71	♀	21-19-15	192	1/1	108/108	8/8	10/10	13,6mm	262mm	93mm
MZUSP 4859	Agrestina, PE	18/5/71	♂	21-19-15	185	1/1	116/113	8/8	10/10	20,4mm	525mm	234mm
MZUSP 4961	Agrestina, PE	18/5/71	♂	21-19-15	188	1/1	105/105	8/8	10/10	19,4mm	450mm	176mm
MZUSP 4958	Agrestina, PE	18/5/71	♂	21-19-15	185	1/1	108/108	7/7	10/10	24,0mm	580mm	230mm
MZUSP 4957	Agrestina, PE	18/5/71	♂	21-19-15	190	1/1	114/114	8/8	10/11	24,8mm	636mm	258mm

cm = cauda mutilada.

Philodryas olfersii (Lichtenstein) continuação

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos: Cabeça	Corpo	Cauda
MZUSP 4960	Agrestina, PE	18/5/71	♂	21-19-15	180	1/1	105/105	8/8	10/10	23,6mm	581mm	240mm
MZUSP 4956	Agrestina, PE	18/5/71	♀	19-19-15	198	1/1	106/106	8/8	10/10	21,8mm	551mm	227mm
MZUSP 4941	Agrestina, PE	18/5/71	♂	19-19-15	182	1/1	112/112	7/7	10/10	14,8mm	270mm	110mm
MZUSP 4937	Agrestina, PE	18/5/71	♀	21-19-15	197	1/1	107/107	8/8	10/10	23,7mm	468mm	170mm
MZUSP 4938	Agrestina, PE	18/5/71	♀	21-19-15	189	1/1	104/104	8/8	11/11	20,7mm	450mm	174mm
DZUSP 4939	Agrestina, PE	18/5/71	♂	21-19-15	181	1/1	111/111	8/8	11/10	23,6mm	404mm	167mm
MZUSP 4936	Agrestina, PE	18/5/71	♀	21-19-15	194	1/1	97/97	8/8	11/11	34,0mm	737mm	253mm
MZUSP 4947	Agrestina, PE	18/5/71	♀	21-19-15	188	1/1	102/102	8/8	10/10	21,5mm	553mm	?
MZUSP 4943	Agrestina, PE	18/5/71	♀	21-19-15	190	1/1	112/112	8/8	11/11	15,2mm	281mm	109mm
MZUSP 4944	Agrestina, PE	18/5/71	♂	19-19-15	183	1/1	101/101	8/8	10/10	18,0mm	411mm	165mm
MZUSP 4940	Agrestina, PE	18/5/71	♂	19-19-15	177	1/1	107/107	8/8	10/10	19,2mm	390mm	165mm
MZUSP 4945	Agrestina, PE	18/5/71	♀	21-19-15	198	1/1	114/114	8/8	10/10	14,8mm	266mm	98mm
MZUSP 4924	Agrestina, PE	15/5/71	♀	21-19-15	198	1/1	105/105	8/8	10/10	23,0mm	593mm	220mm
MZUSP 4926	Agrestina, PE	15/5/71	♂	21-19-15	187	1/1	115/115	8/8	10/10	21,0mm	494mm	215mm
MZUSP 4927	Agrestina, PE	15/5/71	♀	21-19-15	202	1/1	111/111	8/10	11/11	20,5mm	454mm	166mm

CORDEIRO, C. L. & HOGE, A. R. — Contribuição ao conhecimento das serpentes do Estado de Pernambuco.
Mem. Inst. Butantan, 37: 261-290, 1973.

Tantilla melanocephala melanocephala (Linnaeus)

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos		
										Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 607	Sertânia, PE	20/5/70	♀	15-15-15	158	1/1	60/60	7/6	6/6	12,2mm	254mm	80mm
MZUSP 4996	Carnaubeira, PE	24/5/71	♂	15-15-15	150	1/1	62/62	6/6	7/6	10,1mm	270mm	90mm

Thamnodynastes pallidus Linnaeus

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos		
										Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 753	?	?/?/71	♀	17-17-13	149	1	86/86	8/8	9/8	14,8mm	401mm	161mm
MZUSP 5004	Vicência, PE	9/6/71	♂	17-17-13	153	1	91/91	8/8	9/9	12,6mm	363mm	153mm

CORDEIRO, C. L. & HOGE, A. R. — Contribuição ao conhecimento das serpentes do Estado de Pernambuco.
Mem. Inst. Butantan, 37: 261-290, 1973.

Thamnodynastes strigilis (Thunberg)

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 564	Triunfo, PE	26/3/70	♂	19-19-15	145	1/1	50/50	8/8	9/9	17,4mm	354mm	85mm
MZUSP 4985	Carnaubeira, PE	23/6/71	♂	19-19-15	155	1/1	68/68	8/8	9/9	24,2mm	421mm	124mm

Waglerophis merremii Romano e Hoge

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 461	Exú, PE	1/10/69	♂	19-19-17	143	1	44/44	7/7	10/11	27,2mm	540mm	97mm
DEH 291	Saltinho, PE	13/ 5/69	♀	19-19-17	142	1/1	30/30	7/7	10/10	51,2mm	770mm	110mm
DEH 292	Saltinho, PE	13/ 6/69	♀	19-19-17	145	1/1	43/43	7/7	9/9	53,1mm	930mm	135mm
DEH 640	Recife, PE	21/ 8/70	♂	21-19-17	138	1/1	41/41	7/7	9/10	25,5mm	422mm	81mm
DEH 257	També, PE	26/ 8/68	♀	19-19-17	144	1/1	36/36	7/7	10/10	51,1mm	960mm	149mm
DEH 289	Rio Doce, PE	6/ 2/69	♀	19-19-17	151	1/1	43/43	7/7	11/11	46,7mm	790mm	144mm
DEH 516	Camaragibe PE	13/ 1/70	♀	19-19-17	153	1/1	40/40	7/7	11/12	17,5mm	225mm	32mm

Micrurus frontalis altirostris (Cope)

N.º coleção		Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda	Tríadas
DEH	87	PE	19/7/58	♂	15-15-15	215	1/1	21/21	7/7	7/7	12,0mm	378mm	25mm	14

Micrurus ibiboboca (Merrem)

N.º coleção		Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda	Tríadas
DEH	642	Limoeiro, PE	24/ 8/70	♂	15-15-15	232	1/1	14/14+13	7/7	7/7	21,5mm	765mm	54mm	8
DEH	563	Triunfo, PE	26/ 3/70	♂	15-15-15	221	1/1	25/25+2	7/7	7/7	21,6mm	725mm	47mm	9
DEH	561	Triunfo, PE	26/ 3/70	♀	15-15-15	243	1/1	3/3+16	7/7	7/7	9,4mm	278mm	14mm	9
DEH	641	Recife, PE	21/ 8/70	♂	15-15-15	222	1/1	26/26	7/7	7/7	21,6mm	740mm	54mm	8
MZUSP	4980	Carnaubeira, PE	22/ 5/71	♀	15-15-15	233	1/1	15/15 cm	7/7	7/7	23,6mm	750mm	30mm cm	8
IBH	17378	Recife, PE	20/ 4/58	♂	15-15-15	219	1/1	25/25	7/7	7/7	23,0mm	825mm	55mm	7
IBH	25948	Recife, PE	21/10/64	♀	15-15-15	226	1/1	7/7 cm	7/7	7/7	16,6mm	534mm	11mm cm	9
IBH	17363	Recife, PE	18/ 3/58	♀	15-15-15	232	1/1	26/26	7/7	7/7	17,7mm	590mm	49mm	9
IBH	17377	Recife, PE	20/ 4/58	♀	15-15-15	233	1/1	25/25	7/7	7/7	13,1mm	415mm	26mm	3
IBH	17185	Recife, PE	3/ 9/57	♂	15-15-15	231	1/1	26/26	7/7	7/7	26,7mm	1105mm	72mm	8
IBH	28099	Carnaubeira, PE	1/ 3/68	♂	15-15-15	229	1/1	22/22	7/7	7/7	20,3mm	780mm	45mm	8
IEH	74		18/ 2/65	♂	15-15-15	225	1/1	27/27	7/7	7/7	?	860mm	59mm	9

cm = cauda mutilada.

Bothrops erythromelas Amaral

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
IBH 28833	Petrolina, PE	16/6/68	♀	25-21-17	151	1	33/33	8/8	9/10	27,2mm	555mm	67mm
IBH 29263	Petrolina, PE	9/6/58	♀	28-21-17	158	1	34/34	8/8	10/10	33,1mm	673mm	87mm

Crotalus [Crotalus] durissus cascavella Wagler

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 625	Jabotão, PE	9/7/70	♀	31-27-19	175	1	23	15/14	15/17	29,3mm	500mm	40mm
DEH 618	Recife, PE	23/6/70	♂	32-27-20	167	1	28	15/14	16/15	48,5mm	1165mm	120mm
MZUSP 4978	Carnaubeira, PE	22/5/71	♀	33-27-21	172	1	22	15/14	17/17	29,2mm	520mm	47mm
MZUSP 4984	Carnaubeira, PE	22/5/71	♂	33-27-21	175	1	22+7	15/13	17/16	59,2mm	1470mm	185mm
MZUSP 5003	Carnaubeira, PE	22/5/71	♂	30-25-20	169	1	21+7	15/14	15/16	54,5mm	1260mm	172mm

Lachesis muta noctivaga Hoge

N.º coleção	Procedência	Data	Sexo	Dorsais	Ventrais	Anal	Subcaud.	Supralab.	Infralab.	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda
DEH 337	Água Prêta	25/6/69	♀	45-37-26	218	1	32/32+14	9/9	14/15	60,3mm	1640mm	159mm
MZUSP 4977	Barreiro, PE	19/5/71	♀	45-36-28	218	1	35/35	10/10	14/14	62,4mm	1880mm	153mm

CORDEIRO, C. L. & HOGE, A. R. — Contribuição ao conhecimento das serpentes do Estado de Pernambuco.
Mem. Inst. Butantan, 37: 261-290, 1973.

ABSTRACT — In the present paper are registered 28 species of non-poisonous snakes: 3 Boidae and 25 Colubridae; 5 species of poisonous snakes making a total of 250 specimens.

UNITERMS — Northeastern Brazilian snakes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to the Conselho Nacional de Pesquisas for the grant, and to the Departamento de Ecologia da Universidade Federal de Pernambuco.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos ao Conselhos Nacional de Pesquisas pela bolsa e ao Departamento de Ecologia da Universidade Federal de Pernambuco.

BIBLIOGRAFIA

AMARAL, A. — New Genera and Species Snakes. *Proc. New England Zool. Club*, 8: 85-105. 1923.

AMARAL, A. — South American Snakes in the collection of the United States National Museum. *Proc. U. S. Nat. Mus.*, 67(24:1-30, 1925.

AMARAL, A. Sôbre os nomes genéricos de ophidios, *Liophis* Wagler, 1830 e *Leimadophis* Fitzinger, 1843. Revist. Mus. Paulista. 15: 77-78, 1927.

AMARAL, A. — Novos gêneros e espécies de Ophidios brasileiros. *Arch. Mus. Nac. Brasil*, 26: 97-121, Est. II, figs. 9-11, 1926.

AMARAL, A. — Estudos sôbre Ophidios Neotrópicos. XVIII Lista Remissiva dos Ophidios da Região Neotrópica. *Mem. Inst. Butantan*, 4: 129-243, 1929.

AMARAL, A. — Studies of Neotropical Ophidia. XXIII. Additional Notes on Colombian Snakes. *Bull. Antivenin Inst. Amer.*, 4(4): 85-89, 1931.

AMARAL, A. — Notas Sobre a Ofiologia Neotrópica e Brasílica. Distribuição Geográfica e Racial de *Leimadophis poecilogyrus* (Wied). *Pap. Avul. Dept. Zool.*, 5(10): 75-82, 1944.

ANDERSSON, L. G. — Catalogue of Linnean type specimens of Snakes in the Royal Museum in Stockholm. *Bih. till K. Sv. Vet. Akad. Handl.*, 24(6): 1-35, 1899.

BAILEY, J R. — The Snakes of the Genus *Chironius* in Southeastern South America. *Occ. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich.*, (571): 1-21, 1955.

BAILEY, J. R. — In PETERS, J. A. & OREJAS-MIRANDA — Catalogue of the Neotropical Squamata. Part. I Snakes, viii + 347 pp. *U. S. Nat. Mus. Bull.* (297) Smithsonian Institution Press, Washington, 1970

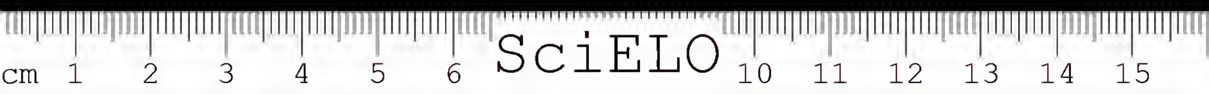
BOETTGER, O. — Liste von Reptilien und Batrachier aus Paraguay. *Abdruck aus Zeits. für Naturwiss.*, 58:234, Sep. (1-36), 1885.

BOULENGER, G. A. — *Catalogue of the Snakes in the British Museum* (Natural History) 1, xiii + 420pp., XXVIIIpl., 1893.

BOULENGER, G. A. — *Catalogue of the Snakes in the British Museum* (Natural History) 2, xi + 382pp., XXpl., 1894.

BOULENGER, G. A. — *Catalogue of the Snakes in the British Museum* (Natural History), 3, xiv + 727pp. XXVpl., 1896.

COPE, E. D. — Catalogue of the Venomous Serpents in the Museum of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, with notes on the families, general and species. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.*, 1859: 332-347, 1859.



DAUDIN, F. M. Histoire Naturelle Génerale et Particuliére des Reptiles 5 (2): 202-365, 1803.

DUMÉRIL, A. M. C. BIBRON, G. & DUMÉRIL, A. — Erpétologie Génerale ou Histoire Naturelle complète des Reptiles. 7(2), xi + 781, 1536pp. Librairie Encyclopédique de Roret, Paris, 1854.

FITZINGER, L. I. — Neue Classification der Reptilien. *Zool. Mus. Wien*, 1-66, 1826.

FITZINGER, L. I. — Systema Reptilium: 6-106, 1843.

FORCART, L. — Nomenclatura Remarks on Some Generic Names of the Snake Family Boidae. *Herpetological*, 7: 197-199, 1951.

GOMES, J. F. — Contribuição para o conhecimento dos Ofídios do Brasil. *Ann. Paulistas Med. Cirug.*, 4(6): 121-129, 1915.

GUNTHER, A. — On new Species of Snakes in the collection of the British Museum. *Ann. Mag. Nat. Hist.*, 9(3): 52-59, IX-X pls., 1862.

HOGE, A. R. —Notas Erpetológicas. 2ª Contribuição dos Ofídios do Brasil Central. *Mem. Inst. Butantan*, 24(2): 215-224, 1952.

HOGE, A. R. — Três notas sobre serpentes brasileiras. *Pap. Dept. Zool. Sec. Agr. S. Paulo*, 13:221-225, 1958.

HOGE, A. R. — Preliminary Account on Neotropical Crotalinae (Serpentes Viperidae). *Mem. Inst. Butantan*, 32:109-184, XX pl., 1965.

HOGE, A. R. & ROMANO, S.A.R.W.D.L. — Neotropical Pit Vipers, Sea Snakes, and Coral Snakes. *In Venomous Animals and their Venoms*. 2: 211-292, Vertebrates. W. Bucherl and Buckley (ed.). *Academic Press*, New York, 1971.

HOGE, A. R. & LIMA-VERDE, J. S. — *Liophis mossoroensis* sp. nov. from Brasil (Serpentes: Colubridae). *Mem. Inst. Butantan*, 36: 215-220 (1972), 1973.

JAN, G. — Enumerazione Sistematica Degli Ofidi Appartenenti Al Gruppo Potomaphilidae. *Helicops* Wagler, 1830. *Arch. Zool. Anat. Fis.*, 3(2): 201-265, 1864.

JAN, G. & SORDELLI, F. — Iconographie Génerale des Ophidiens. Tome Second (Livrais 18 à 34): 1-9. Milan, 1866-70. Tome Troisième (Livrais 35 à 50): 1-19. Milan, 1870-81.

KEISER, E. D. — In PETERS, J. A. & OREJAS-MIRANDA, B. — Catalogue of the Neotropical Squamata. Part. I Snakes, viii + 347 pp., *U. S. Nat. Mus. Bull.*, (297). Smithsonian Institution Press, Washington, 1970

LAURENTI, J. N. — Specimen Medicum exibens Synopsin Reptilium emendatam cum experimentis circa venena et Antidota Reptilium Austriacorum: 1-215, Viennae, 1768.

LAURENT, R. F. — Notes sur quelques Reptiles appartenant a la collection de L'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique. *Bull. Inst. Roy. Sci. Nat. Belgique*, 25(9): 1-20, 1949.

LICHTENSTEIN, H. — Verzeichniss der Doubletten de zoologischen Museums der Königl. Universität zu Berlin nebst Beschreibung vieler bisher unbekannter Arten von Säugethieren, Vögeln, Amphibien und Fischen. *In Comission bei T. Trautwein* : 92-107, Berlin, 1823.

LINNAEUS, C. V. — Systema Naturae Per Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, Cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis. *Tomus I. Editio Decima, Laurentii Salvii* : 214-229, Holmiae, 1758.

LÖNNBERG, E. — Linnean Type — Specimens of Birds, Reptiles, Batrachians and Fisches in the Zoological Museum Upsala. *Bih. till. K. Sv. Vet-Akad. Handl.*, 22 (1): 38, 1896.

MACHADO, O. — Observações sôbre Ofídios do Brasil. *Bol. Inst. Vital Brasil*, 4(27): 61-64, 1944.

MAGLIO, V. J. — West Indian Xenodontine Colubrid Snakes: their probable origin, philogeny, and Zoogeography, *Bull. of the Mus, of Comp. Zoology*, 141(1): 1-53, 1970.

MERREM, B. — Versuch eines Systems der Amphibien — *Tentamen Systematis Amphibiorum* : 1-191, 1820.

MULLER, L. — Ueber neue oder Seltener Mittel — und-sud-Amerikanische Amphibien und Reptilien. *Mitt. Zool. Mus. Berlin,* 11-12: 87-93, 1924.

PETERS, J. A. — The Snakes of the Subfamily Dipsadinae. *Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Mich.,* (114): 1-216, 1960

PETERS, J. A. & OREJAS-MIRANDA, B. — Catalogue of the Neotropical Squamata. Part. I Snakes, viii + 347 pp. illus. *U. S. Nat. Mus. Bull.* (297), Smithsonian Institution Press, Washington, 1970.

ROZE, J A., in PETERS, J. A. & OREJAS-MIRANDA, B. — Catalogue of the Neotropical Squamata. Part. I. Snakes, viii + 347 pp. *U. S. Nat. Mus. Bull.* (297), Smithsonian Institution Press, Washington, 1970.

RUTHVEN, A. G. — The Amphibians and Reptiles of the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Mich.,* (8):6-69, 1922

STEINDACHNER, F. — Uber einige neue oder seltene Reptilien des Wiener Museums. *Sitz. Math. Naturwiss. Cl. Akad. Wiss. Wien.,* 62(1): 326-350, Taf. VII, figs. 1-3, 1870.

SCHLEGEL, H. — Essai sur la Phision. 2: 2-606, La Hayé, 1837.

SCHMIDT, K. P. & WALKER, F. W. — Snakes of the Peruvian Coastal Region. *Zool. Ser. Field. Mus. Nat. Hist.,* 24 (27): 297-324, 1943.

THUNBERB, C. P. — Museum Naturalium Academiae Upsaliensis *Partem primam.* **XIV** : 19-24, Upsaliae, 1787.

WAGLER, J. & SPIX, J. de — Serpentum Brasiliensium Species novae où Histoire Naturelle des Espèces Nouvelles de Serpens, recueillies et observées pendant le voyage dans L'Intérieur du Brésil dans les annés 1817, 1818, 1819, 1820. viii + 75 pp., tab. III, Monachii, 1824.

WAGLER, J. A. — Natürliches System der Amphibien, mit vorangehender Classification der Säugethiere und Vögel : 1-352. München, 1830.

WERNER, F. — Über neue oder seltene Reptilien des Naturhistorischen Museum. *Mitt. Naturhist. Mus. Hamburg,* 26: 206-247, 1909.

Recebido para publicação em 30.VI.72.
Aceito para publicação em 28.VIII.73.

Mem. Inst. Butantan
37: 291-298, 1973

CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS SOBRE CISTOS ESQUIZOGÔNICOS E SOBRE GAMETÓCITOS DE HEPATOZOON (SPOROZOA, HAEMOGREGARINIDAE) PARASITAS DE SERPENTES BRASILEIRAS. *

SAMUEL B. PESSÔA **
PERSIO DE BIASI ***
Seção de Venenos
Instituto Butantan

RESUMO — Os autores mostram a dificuldade existente na caracterização das espécies de *Hepatozoon* parasitas de serpentes, pela morfologia dos cistos esquizogônicos ou dos gametocitos, devido à semelhança daqueles em muitas espécies, bem como a variabilidade destas últimas formas. Dão vários exemplos com microfotografias de *Hepatozoon* parasitas de serpentes para ilustrar esta asserção.

UNITERMOS — *Hepatozoon*, *Haemogregarina*, cistos esquizogônicos, gametócitos, taxonomia.

INTRODUÇÃO

As serpentes podem ser parasitadas por várias espécies de *Hepatozoon*, sendo que o critério taxonômico para separá-las, reside ainda hoje, principalmente, na aparência morfológica de gametócitos no sangue periférico do animal e, mais raramente, também na dos cistos esquizogônicos encontrados nos órgãos internos dos hospedeiros. Após termos examinado, no Instituto Butantan, várias espécies de serpentes venenosas e não venenosas, notamos cistos e gametócitos muito semelhante entre si, de hepatozoons parasitas de diferentes espécies de serpentes.

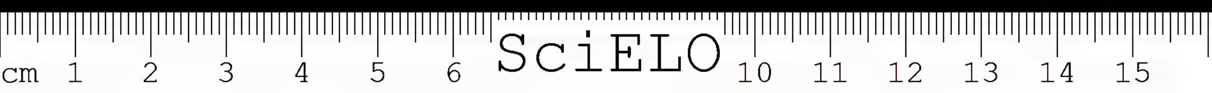
Em ambos os casos, caracteres toxonômicos baseados na morfologia de cistos ou de gametócitos podem ser falhos e levar a se confundir hepatozoons de espécies provavelmente diferentes, apesar de não se saber definitivamente ainda, se diferentes espécies de serpentes albergam ou não, diferentes espécies de hepatozoons.

MATERIAL E MÉTODOS

Os exames de sangue foram feitos sempre de serpentes vivas, pelo seu esfregado em lâminas e coradas pelo Giemsa e às vezes pelo May-Grunwald-

* Trabalho do Instituto Butantan.
** Bolsista do FEDIB.
*** Chefe da Seção de Venenos do Instituto Butantan.

Endereço para correspondência:
C.P. 65, São Paulo, Brasil.



Giemsa. Exames histológicos dos órgãos internos eram feitos somente em caso de ser o animal positivo para hepatozoon, sendo os tecidos fixados pelo formol 10% ou pelo Bouin e os cortes corados pela hematoxilina-eosina; também foram feitas impressões destes órgãos que eram fixadas pelo álcool metílico e coradas pelo Giemsa.

De uma serpente altamente parasitada por hepatozoon e com grande número de formas anômalas dos gametócitos, foi extraído o sangue pelo Dr. Oscar de Sauza Lopes (Instituto Adolfo Lutz) e tentado o isolamento de vírus, com resultado negativo.

RESULTADOS OBTIDOS

A) *Cistos esquizogônicos* — estes cistos do *Hepatozoon* são encontrados em vários órgãos internos das serpentes, sendo vistos mais comumente no fígado e no pulmão, mas podem ocorrer no baço, miocárdio, submucosa intestinal, etc. Como se sabe, os esquizontes do *Hepatozoon* podem formar duas categorias de cistos: os "macrocistos", contendo numerosos pequenos merozoitas — "os micromerozoitas" —, e os "microcistos" que contém poucos "macromerozoitas" com morfologia e tamanho semelhante ao dos gametócitos circulantes nos eritróeitos das serpentes. MacKerras (1961) denomina aos primeiros de esquizontes X e aos segundos de esquizontes Y; mas tanto a origem como o destino de ambos são ainda obscuros.

Baseados na morfologia de tais cistos, a separação específica em muitos casos pode ser falha. Assim, nas figuras 1 a 4 temos microfotografias de cistos de *Hepatozoon* morfologicamente idênticos, encontrados em 4 diferentes espécies de serpentes:

Philodryas aestivus, serpente n.º 233, procedente de Jundiaí, SP, em 1/2/1966, corte de cisto no miocárdio (fig. 1);

Spillotes pullatus pullatus, serpente n.º 317, procedente de Três Lagôas, MT, em 28/3/1967, corte de pulmão (Fig. 2);

Crotalus durissus terrificus, serpente n.º 352, de Santa Rita do Passa Quatro, SP, em 27/3/1967, corte de cisto no fígado (fig. 3);

Helicops modestus, sem procedência, corte de fígado (fig. 4).

Pelo exame destas microfotografias, vê-se que os cistos esquizogônicos, morfologicamente idênticos, impossibilitam a separação específica somente baseada em sua morfologia.

Exemplos de "microcistos" com dois ou três macroesquizontes, que também se mostram morfologicamente idênticos, temos nas serpentes:

a) com somente dois esquizontes:

Mastigodryas bifossatus bifossatus, serpente s/n.º, corte de fígado (fig. 5);
Liophis miliaris, serpente n.º 310, corte de fígado (fig. 6);
Bothrops jararaca, serpente n.º 312, procedente de Araguaia, corte de fígado (fig. 7);

b) com três esquizontes:

Chironius flavolineatus, cobra n.º 62, procedente de Ponta Grossa, PR, em 25/11/1966, corte de fígado (fig. 8);
Philodryas patagonicnsis, serpente n.º 74, procedente de São José dos Pinhais, em 29/4/1966, esfregaço de fígado (fig. 9).

Também se verifica a impossibilidade da separação específica por meio destes cistos.

Achamos desnecessário citar outros exemplos, entretanto, queremos fazer notar que de fato, há cistos que diferem muito uns dos outros nas diferentes espécies, mas há cistos semelhantes encontrados em espécies de serpentes taxonomicamente distantes.

B) *Gametócitos* — temos freqüentemente encontrado ao lado das formas normais, outras formas de gametócitos no sangue de várias espécies de serpentes.

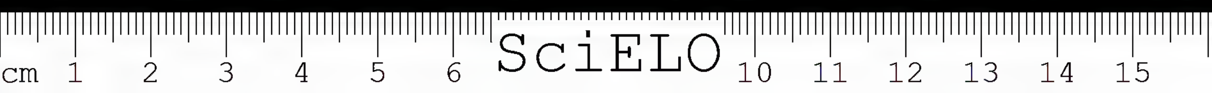
Na *Hydrodynastes gigas, Liophis miliaris* e *Helicops carinicaudus* (figs. 10, 11 e 12) ocorrem gametócitos que se caracterisam pelo grande desenvolvimento do citoplasma com aspecto esponjoso, os quais ocasionam grande alongamento do eritócito parasitado e deslocamento de seu núcleo para um ds pólos da célula. O eritrócito não parece entretanto apresentar alterações, como as que se encontram, por exemplo, nos núcleos dos eritrócitos parasitados por espécies pertencentes ao gênero *Karyolysus* Labbé, 1894.

O parasita chega a alcançar até 30 microns de comprimento e a célula 35 microns. A serpente que apresenta mais freqüentemente estas formas é a *Liophis miliaris*.

Além das espécies acima citadas, encontramos esta forma ocorrendo também no *Chironius bicarinatus* (cobra-cipó).

Os gametócitos do hepatozoon da *Liophis miliaris* podem apresentar ainda outras formas, que nos parecem anormais (figs. 13, 14 e 15) vemos que são arredondadas ou ovaladas, deslocando fortemente o nkcleo e hipertrofiando o glóbulo vermelho. Tais formas se aproximam dos gametócitos que encontramos na *Hydrodynastes* gigas (fig. 16).

Finalmente, na *Philodryas patagoniensis* (fig. 17), há uma forma por nós encontrada, em que o hepatozoon apresenta uma parte delgada, em forma de cauda, extremamente exagerada. O núcleo do eritrócito fica deslocado e achatado, talvez devido à compressão mecânica.



PESSOA, S. B. & BIASI, P. — Considerações taxonômicas sobre cistos esquizogônicos e sobre gametócitos de *Hepatozoon* (Sporozoa, Haemogregrarinidae) parasitas de serpentes brasileiras.
Mem. Inst. Butantan, 37: 291-298, 1973.

COMENTÁRIOS

Pensamos que este nosso estudo está de acordo com o ponto de vista de Hull e Camin (1960), quando mostram a impossibilidade da separação específica de hepatozoons somente pelas diferenças morfológicas das formas intraeritrocitárias. Aqui vamos mais longe, pois também encontramos tal impossibilidade se quisermos nos basear nas formas esquizogônicas que se multiplicam nas células do sistema retículo-endotelial. Para Acholonu (1964) a evolução dos hepatozoons em varias categorias de invertebrados, por exemplo, mosquitos, sanguessugas, carrapatos, etc. seria elemento indiscutível para sua separação. Porém, como Pessôa e cols. (1970) mostraram, o hepatozoon da *Hydrodynastes gigas* pode evoluir em sanguessuga e em mosquito, o que levou aqueles autores a concluirem ser a serpente em apreço parasitada por duas espécies diferentes de *Hepatozoon*. Para Hull e Camin (1956), somente a transmissão experimental dos parasitas entre espécies diferentes de serpentes poderá resolver a questão. Seria, como lembrou Brumpt (1946) a utilização do xenodiagnóstico para a identificação das espécies de *Hepatozoon*.

Segundo Krasilnikov (1969), a evolução do hepatozoon se processa por aumento de tamanho do gametócito; inicialmente a capsula e o gametócito no seu interior permanecem ovais; após, o gametócito dobra-se formando uma concavidade (forma em "jack-knife") e posteriormente aparecem as formas com longos processos caudais. Segundo o autor em apreço tais formas de hepatozoon ocorrem unicamente no Cáucaso. Entre nós também ocorrem estas formas, em espécies diversas de hepatozoons das serpentes, e damos uma figura do *Hepatozoon* da *Philodryas patagoniensis* (fig. 17) para ilustrar esta asserção, porém as temos encontrado em outras espécies.

Terminando estes comentários, não podemos ainda afirmar que existe uma só espécie de hepatozoon parasita de serpentes, porém pensamos que, é necessário intensificar as experiências que já vem sendo feitas em pequena escala, relativamente à transmissão experimental entre serpentes criadas em laboratório e livres de qualquer contato com possíveis agentes transmissores, para podermos resolver a importante questão das espécies válidas do gênero *Hepatozoon*.

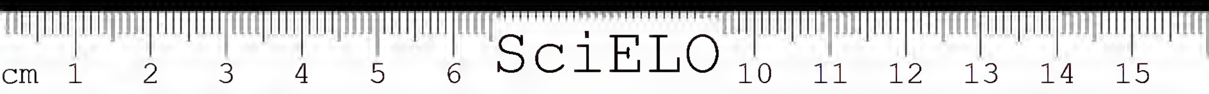
SUMARY — The authors show that the characterization of *hepatozoon* species parasiting snakes, based on the morphology of the schizogonic cysts and on the gametocytes in the peripheric blood, is difficult due to the similarity of the former in a great number of species, and to the variability of the latter.

UNITERMS — *Hepatozoon, Haemogregarina*, schizogonic cysts, gametocytes, taxonomy.

BIBLIOGRAFIA

ACHELONU, A. — 1969 — Haemogregarina (Sporozoa) in Ophidians from Louisiana. *Progress in Parasitology* III: 331.

BRUMPT, E. — 1946 — Contribution a l'étude d'*Hepatozoon muris*. Utilisation du



xénodiagnostic pour l'identification des spéces d'*Haemogregarines*. *Ann. Parasit. Hum. et Comparée* 21: 1-64.

HULL, R. W. & CAMIN, H. — 1956 — Blood Parasites in Reptiles. *Jour. Parasit.* 42 (Suppl.): pp. 36.

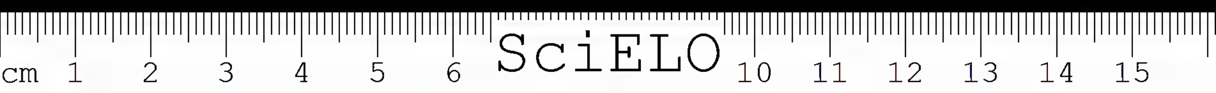
HULL, R. W. & CAMIN, H. — 1960 —Haemogregarines in snakes: the incidence and identity of the erytrocytic stages. *Jour. Parasit.* 46: 515-523.

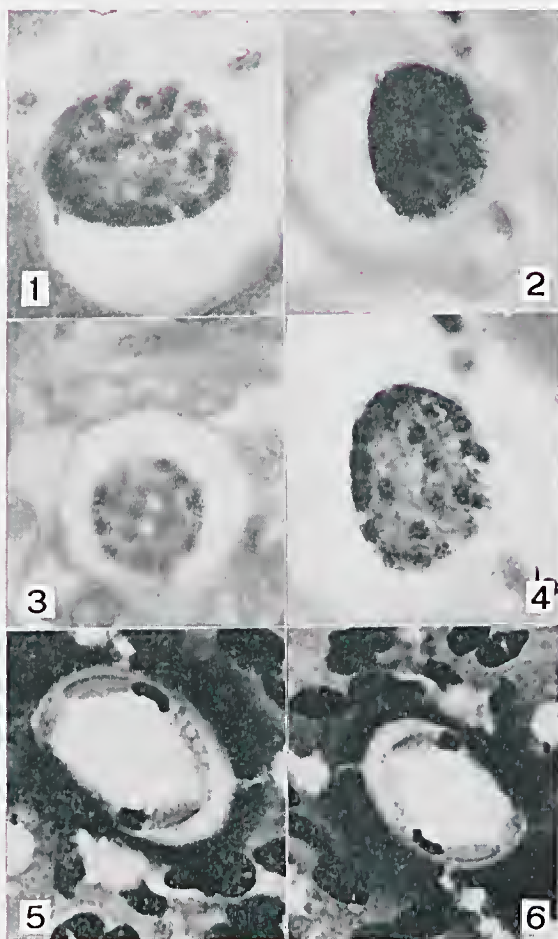
KRASILNIKOV, E. N. — 1969 — Reptilian haemogregarines and their evolution. *Progress in Parasitology* III: 378.

MAC KERRAS, M. J. — 1961 — The Hematozoa of Australian reptiles. *Austr. Jour. Zool.* 9: 61-122.

PESSÔA, S. B., SACCHETTA, L. & CAVALHEIRO, J. — 1970 — Notas sobre Hemogregarinas de serpentes brasileiras. X — Hemogregarinas da *Hydrodynastes gigas* (Duméril et Bibron) e sua evolução. *Rev. latino-americ. Microb.* 12: 197-200.

Recebido para publicação em 18.VI.73.
Aceito para publicação em 15.IX.73.





Figs. 1 a 4. Cistos esquizogônicos (macrocistos) de: 1. *Philodryas aestivus*; 2. *Spilotes pullatus pullatus*; 3. *Crotalus durissus terrificus*; 4. *Helicops modestus*.

Figs. 5 e 6. Cistos esquizogônicos (microcistos com 2 esporozoitas): 5. *Mastigodryas bifossatus bifossatus*; 6. *Liophis miliaris*.

(Aumento x 1.500)

PESSOA, S. B. & BIASI, P. — Considerações taxonômicas sobre cistos esquizogônicos e sobre gametócitos de *Hepatozoon* (Sporozoa, Haemogregrarinidae) parasitas de serpentes brasileiras.
Mem. Inst. Butantan, *37*: 291-298, 1973.

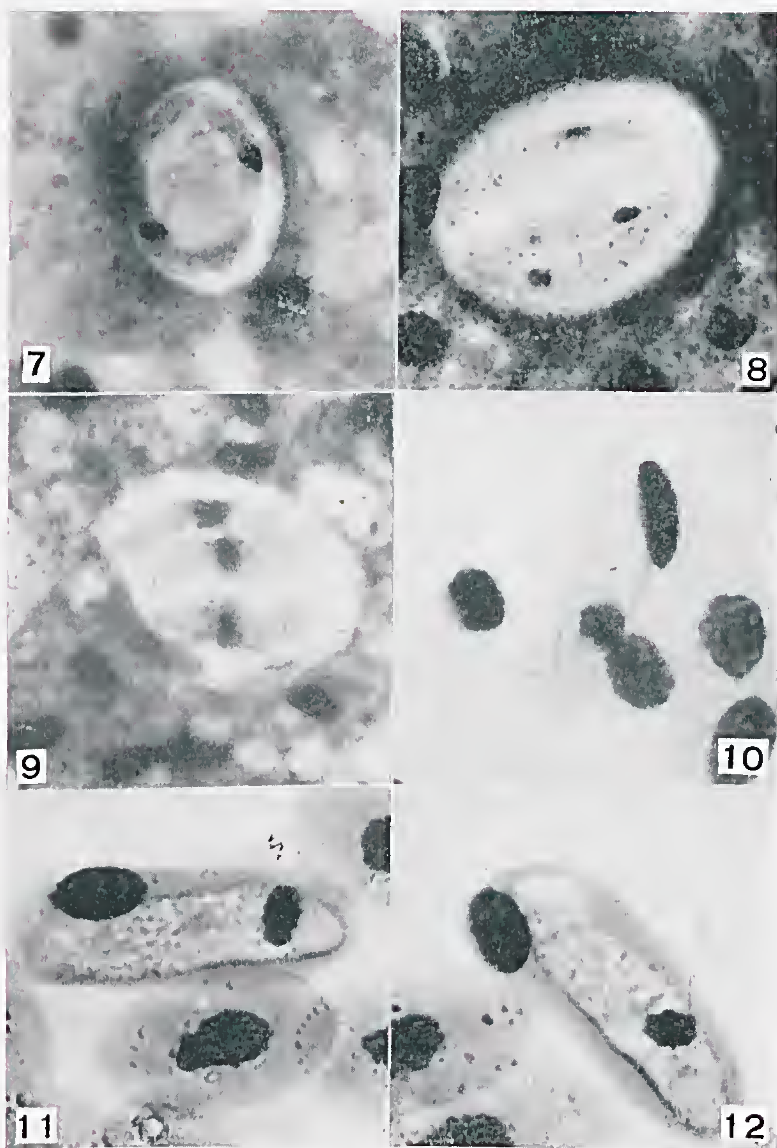


Fig. 7. Cisto esquizogônico (microcisto com 2 esporozoitas): *Bothrops jararaca*.

Figs. 8 e 9. Idem (idem com 3 esporozoitas): 8. *Chironius flavolineatus*; 9. *Philodryas patagoniensis*.

Figs. 10 a 12. Gametócitos alongados: 10. *Hydrodynastes gigas*; 11. *Liophis miliaris*; 12. *Helicops carinicaudus*.

(Aumentos: figs. 7 a 9, x 1.500; figs. 10 a 12, x 1.800)

PESSOA, S. B. & BIASI, P. — Considerações taxonômicas sobre cistos esquizogônicos e sobre gametócitos de *Hepatozoon* (Sporozoa, Haemogregrarinidae) parasitas de serpentes brasileiras.
Mem. Inst. Butantan, *37*: 291-298, 1973.

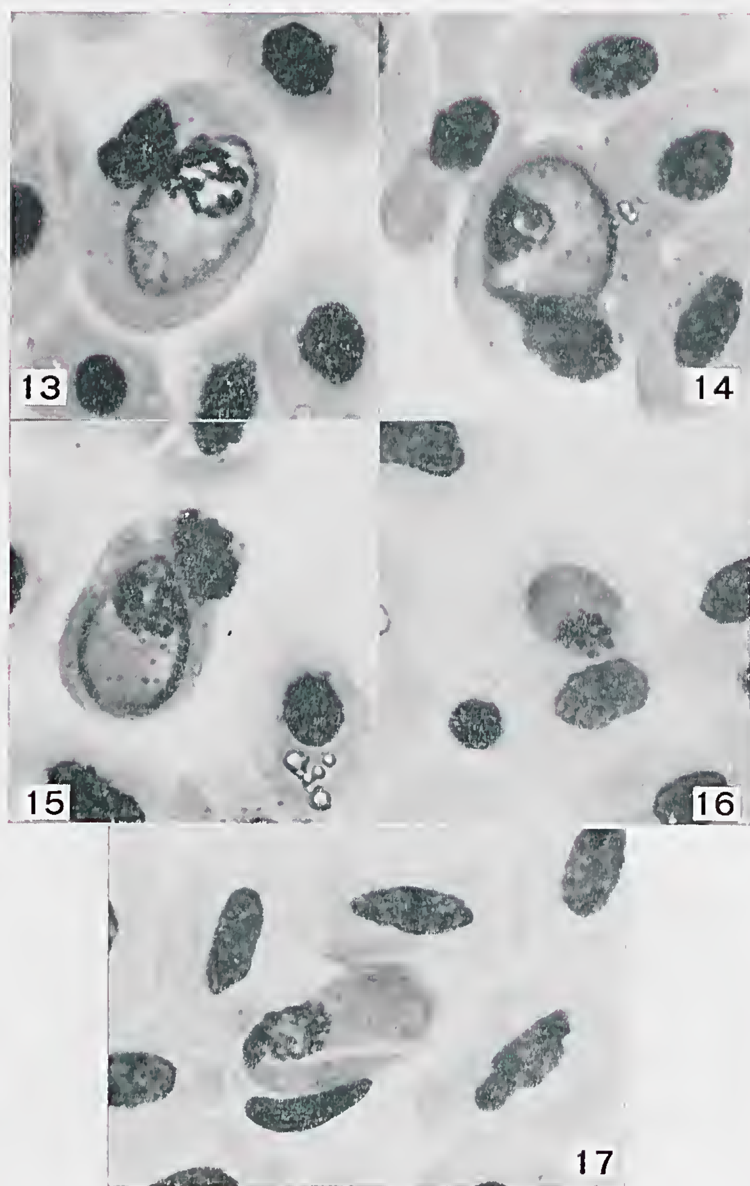


Fig. 13. Gametócito ovalado: *Liophis miliaris.*
Figs. 14 a 16. Gametócitos arredondados: 14 e 15. *Liophis miliaris*; 16. *Hydrodynastes gigas.*
Fig. 17. Gametócito com grande prolongamento: *Philodryas patagoniensis.*

(Aumento x 1.800)

Mem. Inst. Butantan
37: 299-307, 1973

NOTA TAXONÔMICA SOBRE CISTOS ESPOROGÔNICOS DE ALGUMAS ESPÉCIES DE *HEPATOZOON* (*SPOROZOA, HAEMOGREGARINIDAE*) PARASITAS DE SERPENTES BRASILEIRAS *

SAMUEL B. PESSÔA **
PERSIO DE BIASI ***

Seção de Venenos — Instituto Butantan

RESUMO — Os autores estudam a morfologia das formas esporogônicas, principalmente dos cistos e esporocistos de espécies de *Hepatozoon* parasitas de serpentes, Após fazerem uma revisão do assunto e terem analisado estas diversas formas em hospedeiros intermediários, como sanguessuga, carrapato e mosquito, chegam à conclusão de serem elas muito uniformes, não se prestando, diferenças morfológicas acaso encontradas, para a caracterização taxonômica das espécies do gênero *Hepatozoon* parasitas de serpentes.

UNITERMOS — *Hepatozoon, Haemogregarina,* cistos esporogônicos, taxonomia.

INTRODUÇÃO

Em nota anterior os autores (1973)[1], fizeram alguns comentários taxonômicos sobre gametócitos e cistos esquizogônicos de *Hepatozoon* parasitas de algumas espécies de serpentes brasileiras. Esta nota pode ser considerada a segunda parte daquela, pois agora abordamos em nossos comentários os cistos esporogônicos das serpentes referidas na nota anterior.

Também aqui queremos mostrar as dificuldades em se caracterizar as espécies de *Hepatozoon* parasitas de serpentes, empregando-se critérios morfológicos das formas evolutivas.

Damos no Quadro I a relação dos *Hepatozoon* parasitas das serpentes estudadas e dos hospedeiros intermediários em que evoluem.

MÉTODOS EMPREGADOS

Os métodos usados para a infecção dos hospedeiros intermediários, já foram dados em artigos anteriores e citados na bibliografia deste trabalho.

Quanto ao carrapato achado, que ainda não tínhamos publicado, trata-se do encontro de esporocistos isolados (provavelmente devido à ruptura de

* Trabalho feito com auxílio do Fundo Especial de Despesas do Instituto Butantan.
** Bolsista do FEDIB.
*** Chefe da Seção de Venenos do Instituto Butantan.

Endereço para correspondência:
C.P. 65, São Paulo, Brasil.



um oocisto) em um *Amblyomma agamum* Aragão, 1912, que parasitava a serpente *Pseustes sulphureus*, parasitada por sua vez, por uma espécie de *Hepatozoon*, ainda não descrita. Quando à espécie de sanguessuga usada, tem sido a *Haementeria lutzi*, criada em laboratório e capturada em Goiânia, Estado de Goiás.

QUADRO I

N.º de registro	Nome da serpente	Data da publicação	Hospedeiros intermediários	Observações
794 1072	*Liohis miliaris* *Liophis miliaris*	1969 (2)	*Haementeria lutzi*	Sanguessuga
897	*Helicops carinicaudus*	1969 (3)	*Haementeria lutzi*	Sanguessuga
56	*Hydrodynastes gigas*	1970 (4)	*Haementeria lutzi* *Culex fatigans*	Sanguessuga Mosquito
1111	*Hydrodynastes gigas*	1971*	*Haementeria lutzi* *Culex fatigans*	Mosquito
NS.719	*Leptophis ahaetula*	1973*	*Culex fatigans*	Mosquito
NS.276	*Corallus caninus*	1970 (5)	*Culex fatigans*	Mosquito
NS.282	*Thamnodynastes strigatus*	1970 (6)	*Culex dolosus*	Mosquito
H- 41 H-401	*Bothrops moojeni* *Bothrops moojeni*	1971 (7)	*Culex dolosus*	Mosquito
H-131	*Bothrops alternatus*	1972 (8)	*Culex dolosus*	Mosquito
886	*Pseustes sulphureus*	1969*	*Amblyomma agamum*	Carrapato

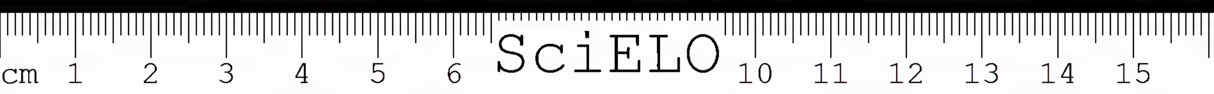
* Publicado pela primeira vez neste trabalho.

Em relação aos mosquitos, usamos, mais freqüentemente o *Culex dolosus*, pois, parece-nos que pica com maior facilidade animais de sangue frio, do que o *Culex fatigans*. Todas as espécies usadas foram criadas em laboratório.

A temperatura em que se desenvolveram os cistos, foi geralmente de 26 a 28°C e a umidade entre 75 a 80%. A dissecção dos hospedeiros intermediários foi feita em tempo variável, desde 2 a 3 dias, até 30 dias após a sucção do sangue da serpente. A análise da morfologia dos cistos só foi feita nas bases dos cistos maduros, pois quanto aos jovens, ao que parece, apresentam morfologia muito semelhante para todas as espécies consideradas.

RESULTADOS

Oocistos — Nos oocistos que se desenvolvem na cavidade geral dos mosquitos pode-se perceber uma membrana externa delgada e transparente. O esporoblasto e posteriormente também o esporocisto, são envolvidos por outra



delgada membrana anista e entre as duas fica um espaço contendo um líquido incolor (Fig. 1).

Já nos oocistos que se desenvolvem em sanguessugas, não pudemos perceber a membrana externa, mas neste caso o esporoblasto e, posteriormente, os esporocistos, são envolvidos por uma única e delgada membrana anista (Fig. 2).

A existência de dupla membrana nas espécies encontradas na cavidade geral de mosquitos nem sempre ocorre, pois pode-se encontrar oocistos desprovidos de membrana externa, como nos mostra a microfotografia de oocisto de *Corallus caninus* na cavidade geral do *Culex* (Fig. 3).

Quanto ao número de oocistos, varia muito para uma mesma espécie, pois podemos encontrar um único no mosquito (Fig. 4) até algumas dezenas (Fig. 5). Também os que se desenvolvem na sanguessuga são em grande número e parecem forrar o tecido mole subcuticular do hirudíneo (Figs. 6 e 7 oocistos do *Hepatozoon* da *Liophis miliaris*). Nos primeiros dias após a picada os oocistos parecem se mostrar na mesma fase de desenvolvimento, sendo todos de tamanho quase idênticos (Fig. 8 — oocistos de *Hepatozoon* da *Bothrops moojeni*). Nos dias que se seguem, alguns oocistos se desenvolvem mais rapidamente que seus irmãos, como se pode ver pela microfotografia (Fig. 9), que mostra dois oocistos do *Hepatozoon* de *Corallus caninus* no *Culex fatigans*, em que um deles se desenvolveu mais rapidamente que o outro, alcançando diâmetro maior, com maior número de esporocistos, ainda que pareçam ser da mesma idade. É o que encontramos freqüentemente nos *Culex* dissecados em datas diferentes, porém que picaram as serpentes no mesmo dia. Encontram-se todas as fases de evolução dos oocistos, desde os muito jovens até os completamente maduros, quando o mosquito é dissecado de 12 a 15 dias após o engurgitamento. Pensamos que, na evolução do Hepatozoon no mosquito intervenham outros fatores, além da temperatura e umidade, sendo que um deles deve ser o de maior ou menor grau de susceptibilidade individual do díptero.

O tamanho é também variável, pois podemos encontrar oocistos muito grandes de modo a parecerem prejudicar a vida do inseto. Ver a Fig. 10, que nos mostra um corte de um *Culex fatigans* com oocistos de *Hepatozoon* da *Corallus caninus* (serpente n.º 226).

Esporocistos — No interior do oocisto, o esporoblasto pode se dividir previamente em 2, 3 e mais massas (Fig. 11 — esporoblastos do hepatozoon de *B. moojeni*), que após darão os esporocistos, ou então permanecem indivisos e dão diretamente os numerosos esporocistos. O número dos esporocistos no oocisto varia, porém em geral são muito numerosos. Na fig. 12, temos um oocisto com 9 esporocistos do hepatozoon da *Liophis miliaris*, na sanguessuga, e na Fig. 13 um oocisto com uma centena de esporocistos do hepatozoon da *B. moojeni*.

Às vezes, provavelmente devido à alteração da temperatura ou da umidade, o oocisto e o esporoblasto se degeneram e este último se transforma em uma massa amorfa (Fig. 14), ou então as paredes dos esporocistos, bem como a membrana do oocisto se espessam, desaparece a estrutura dos esporozoítas que se transformam em uma massa amorfa (Fig. 15).



Esporozoítas — O número dos esporozoítas nos esporocistos também é variável em uma mesma espécie. Damos na Fig. 16 um exemplo de três esporocistos do *Hepatozoon* da *C. caninus*, em que se pode notar perfeitamente este fenômeno. Os esporozoítas que se desenvolvem na sanguessuga (Fig. 17 *Hepatozoon* da *Hydrodynastes gigas*, serpente n.º 1.111), não parecem diferir morfologicamente daqueles que se desenvolvem em mosquitos (Fig. 18), bem como no carrapato (Fig. 19 — esporocisto com esporozoítas encontrado no carrapato *A. agamum* parasitando a serpente n.º 816, por sua vez parasitada por *Hepatozoon* sp.)

Em alguns casos os esporozoítas (*Hepatozoon* da *B. moojeni*, *B. jararaca*, etc.), ao que parece, se originam de uma zona central do esporoblasto, que permanece indivisa, como se pode ver pela microfotografia Fig. 20. Tal aparência nunca tivemos ocasião de ver em esporozoítas que se desenvolvem em sanguessugas.

CONCLUSÃO

Do que ficou relatado concluímos sobre a grande uniformidade morfológica dos cistos e esporocistos de espécies de hepatozoon parasitas de serpentes mesmo quando estas se acham colocadas bem distantes na escala toxonômica.

O mesmo se verifica ao compararmos estes parasitas encontrados em sanguessuga e em mosquitos, evoluindo o hemosporídio de maneira bastante uniforme em ambos os hospedeiros, apresentando, é claro, diferenciação morfológica ligada à sua adaptação em hirundíneos e artrópodes. Chegamos a obter evolução de hemogregarina de uma serpente (*Hydrodynastes gigas*) em mosquito e em sanguessuga, que, provisoriamente consideramos como espécies distintas. Mas esta conclusão não está demonstrada, sendo possível considerá-la uma única espécie evoluindo em dois hospedeiros diversos. Só conseguimos ver esporocistos e esporozoítas uma única vez em carrapato, sendo o aspecto destes organismos idênticos aos encontrados em sanguessugas e em mosquitos.

Ao nosso ver, torna-se processo dificilmente utilizável na prática da sistemática do gênero *Hepatozoon* tentar a classificação das suas diversas espécies baseando-se na morfologia das formas esporogônicas do organismo. Aliás seria também processo excessivamente trabalhoso, principalmente quando se trata de espécies de *Hepatozoon* parasitando serpentes muito raramente encontradas na natureza.

SUMARY — The authors make comments on the sporogonic cysts of some species of *Hepatozoon* parasites of Brazilian snakes.

The study of these cysts and sporocysts in mosquitoes, leeches and ticks shows that they are very similar to each other and do not evidence adequate characteristics for their separation.

UNITERMS — *Hepatozoon*, *Haemogregarina*, sporogonic cysts, taxonomy.

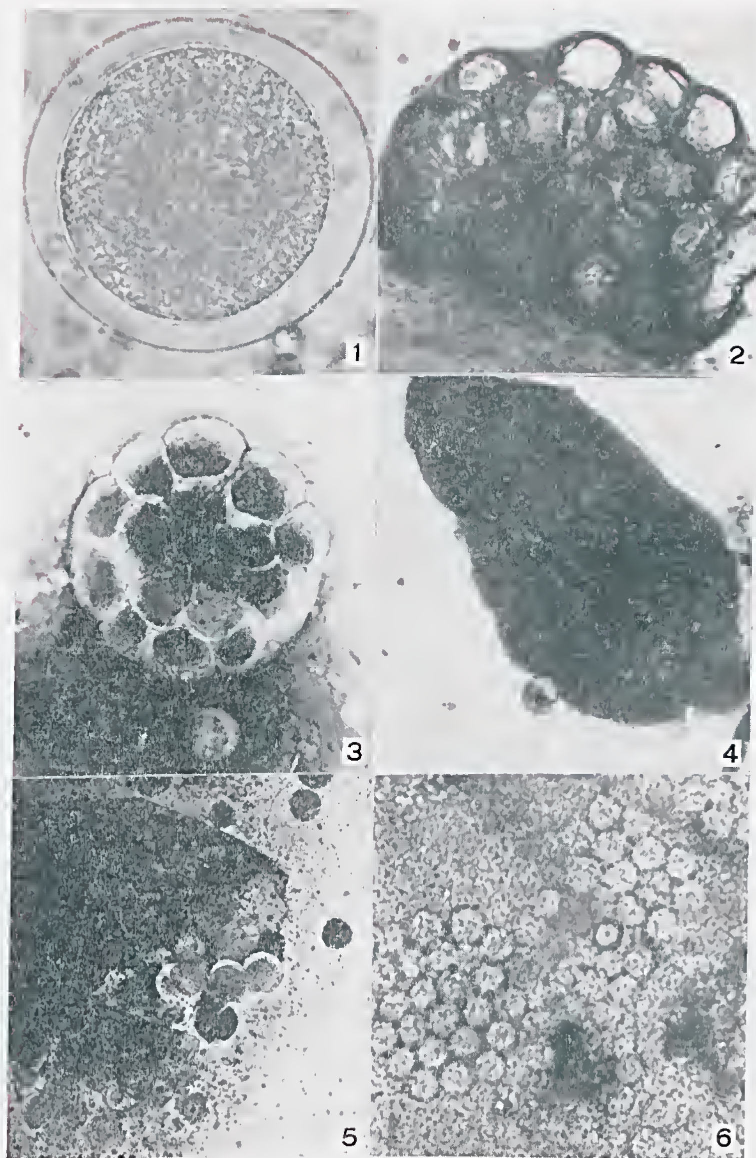


Fig. 1 — Oocisto do *Hepatozoon* da *Bothrops moojeni* no *Culex fatigans.*

Fig. 2 — Oocisto maduro de *Hepatozoon* da *Helicops carinicaudus* na sanguessuga.

Fig. 3 — Oocisto do *Hepatozoon* da *Corallus caninus* no mosquito.

Fig. 4 — Um único oocisto na cavidade geral do *Culex*.

Fig. 5 — Numerosos oocistos na cavidade geral do *Culex* (*Hepatozoon* da *Corallus caninus*).

Fig. 6 — Oocistos com esporocistos na sanguessuga (*Hepatozoon* da *Liophis miliaris*), visto por compressão do corpo do Hirudineo.

(Aumentos: figs. 1, 2, 3 — x 320; figs. 4, 5, 6 — x 40)

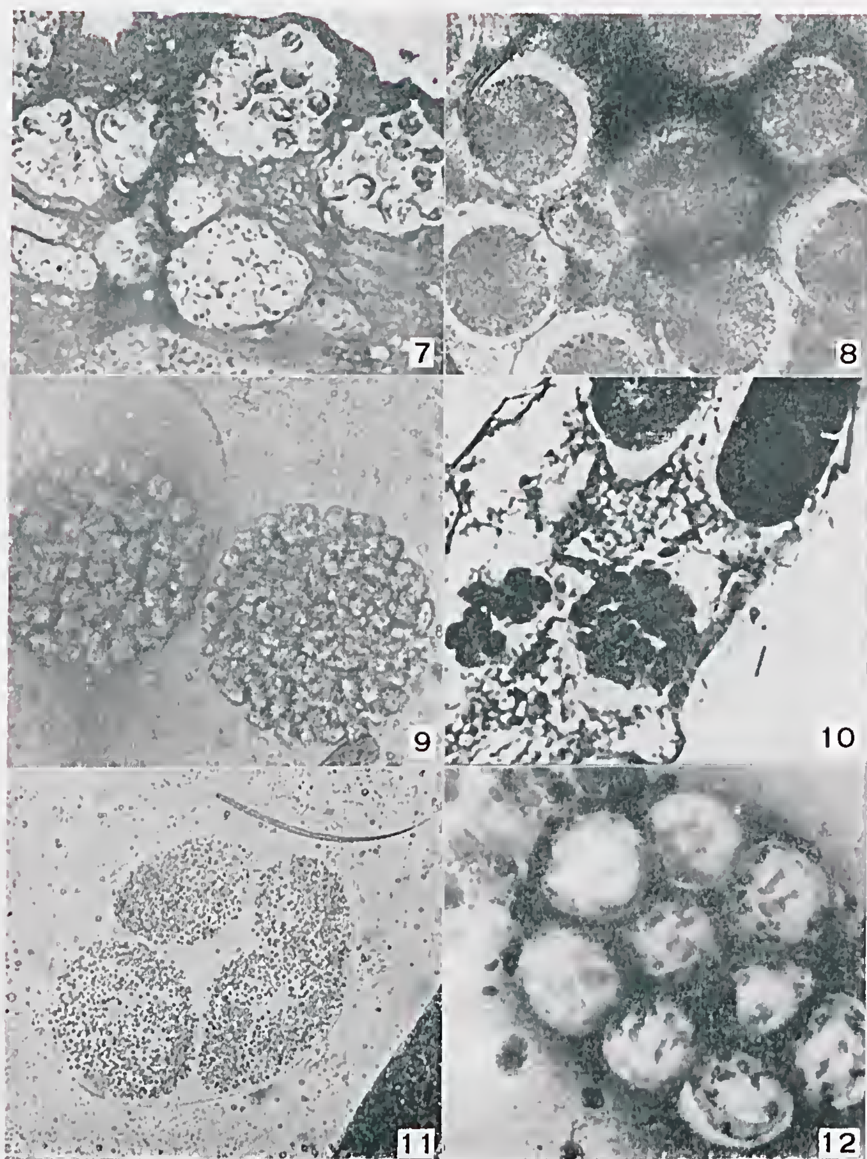


Fig. 7 — Oocistos com esporocistos na sanguessuga (*Hepatozoon* da *Liophis miliaris*), vistos por corte da parede da sanguessuga.

Fig. 8 — Oocistos jovens do *Hepatozoon* da *Bothrops moojeni* no mosquito.

Fig. 9 — Oocistos maduros no *Culex* (*Hepatozoon* da *Corallus caninus*).

Fig. 10 — Corte de *Culex* para mostrar oocistos de grande tamanho (oocistos do *Hepatozoon* da *Corallus caninus*).

Fig. 11 — Esporoblasto em divisão em um oocisto de *Hepatozoon* da *Bothrops moojeni* no *Culex dolosus*.

Fig. 12 — Oocisto com nove esporocistos maduros (*Hepatozoon* da *Liophis miliaris* na sanguessuga).

(Aumentos: Figs. 7, 9, 11 e 12 — x 320; fig. 8 — x 80; fig. 10 — x 40)

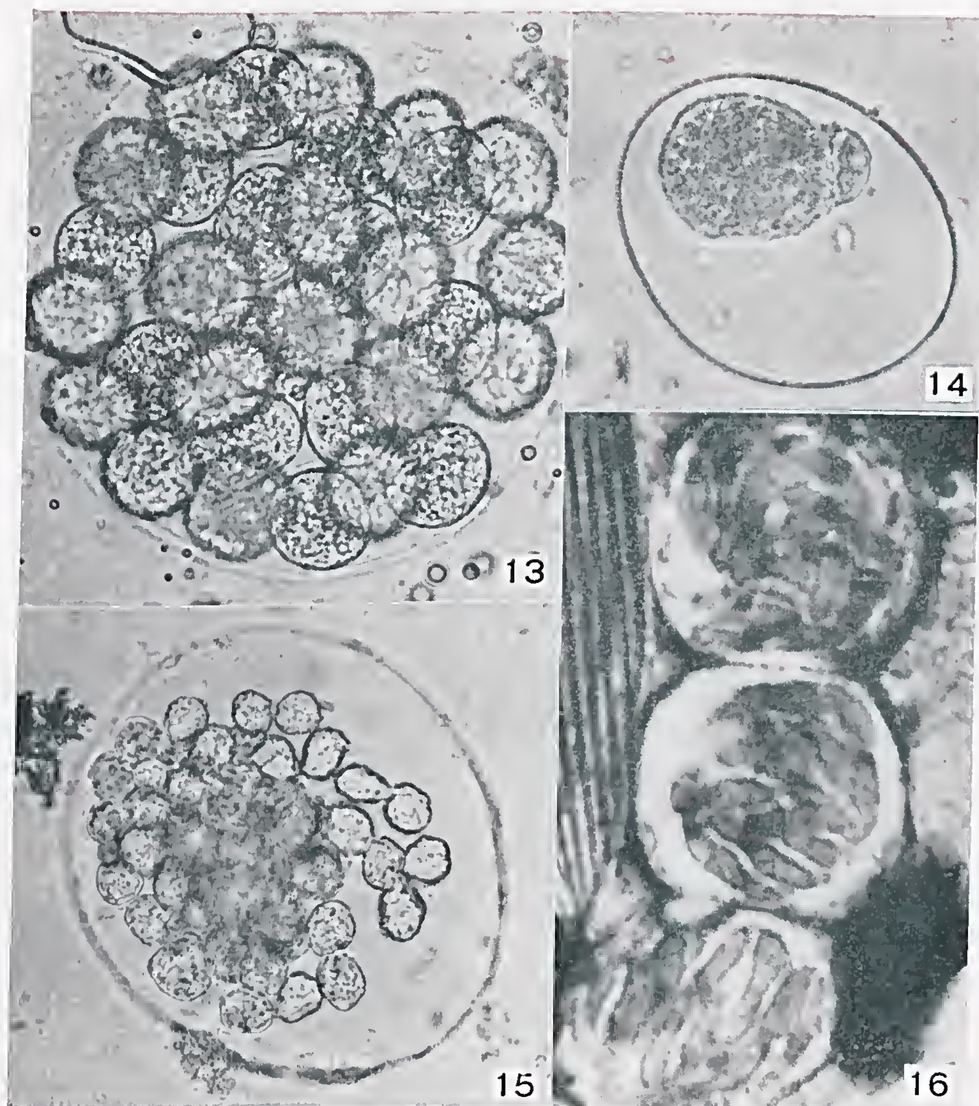


Fig. 13 — Oocisto com numerosos esporocistos (*Hepatozoon* da *B. moojeni* no Culex).
Fig. 14 — Oocisto degenerado, o esporoblasto se transforma em uma massa amorfa.
Fig. 15 — Oociste degenerado; os esporocistos apresentam as paredes muito degeneradas.
Fig. 16 — Esporocistos de *Hepatozoon* da *C. caninus*, em mosquito *Culex*.
(Aumentos; figs. 13, 14 e 15 — x 370; fig. 16 x x 1.400)

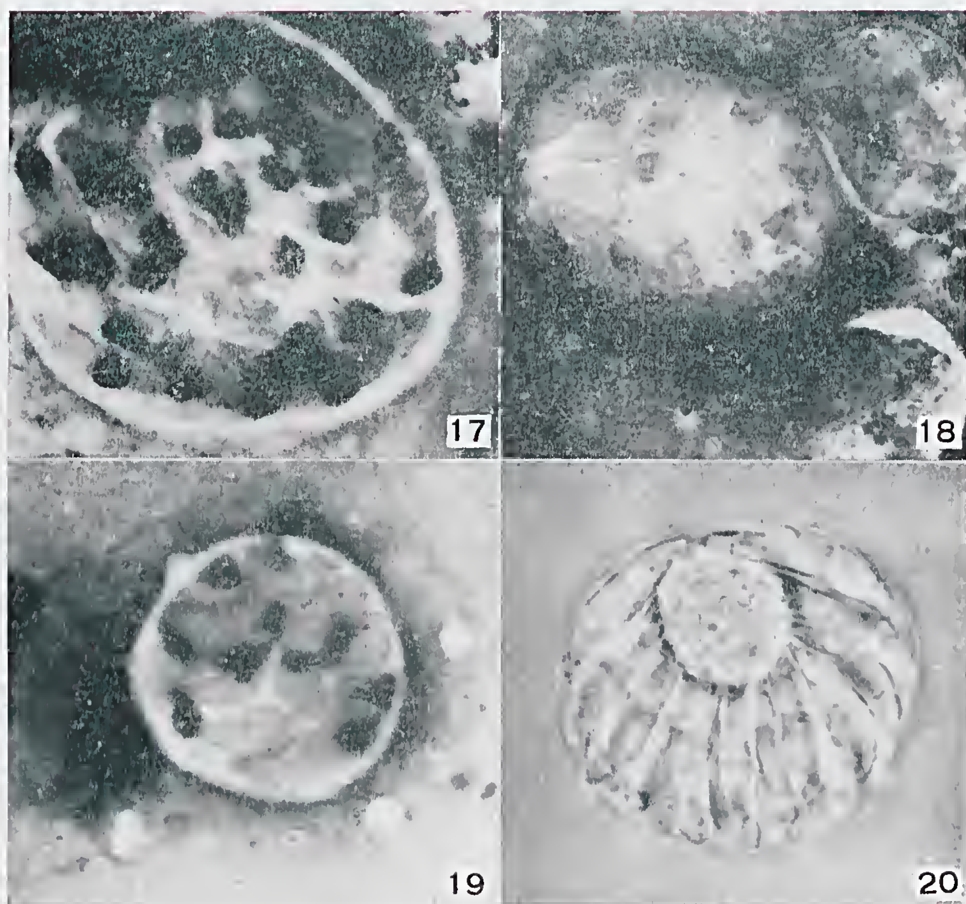


Fig. 17 — Esporozoítas do *Hepatozoon* da *Hydrodynastes gigas* na sanguessuga.
Fig. 18 — Esporozoítas do *Hepatozoon* da *Corallus caninus* no mosquito.
Fig. 20 — Esporocisto com esporozoítas do *Hepatozoon* da *B. moojeni*, na cavidade geral do *Culex dolosus*.

(Aumento de todas figs.: 1.550 x)

BIBLIOGRAFIA

1. PESSÔA, S. B. & BIASI, P. — 1973 — Em publicação.

2. PESSÔA, S. B. & CAVALHEIRO, J. — 1969 — *Rev. Bras. Biol.* 29 (4): 451.

3. PESSÔA, S. B. & CAVALHEIRO, J. — 1969 — *Rev. Goiana Med.* 15: 155.

4. PESSÔA, S. B. & CAVALHEIRO, J. — 1970 — *Rev. lat.-amer. Microb.* 12: 197.

5. PESSÔA, S. B., CAVALHEIRO, J. & SOUZA, D. M. — 1970 — *Arq. Inst. Biol. S. Paulo* 37: 205.

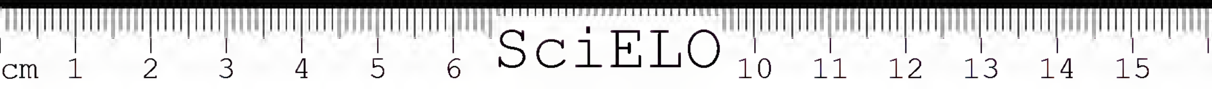
6. PESSÔA, S. B., CAVALHEIRO, J. & SOUZA, D. M. — 1970 — *Arq. Inst. Biol. S. Paulo* 37: 253.

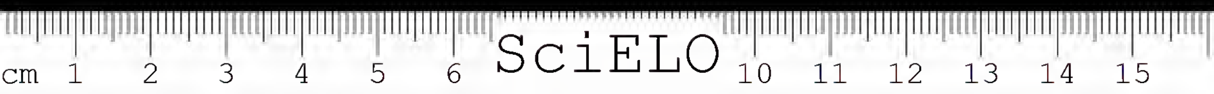
7. PESSÔA, S. B., BELLUOMINI, H. E., BIASI, P. & SOUZA, D. M. — 1971 — *Arq. Inst. Biol. S. Paulo* 38: 253.

8. PESSÔA, S. B., BIASI, P. & SOUZA, D. M. — 1972 — *Mem. Inst. Butantan* 36: 241-244.

Recebido para publicação em 18.VI.73.

Aceito para publicação em 15.IX.73.




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

Mem. Inst. Butantan
37: 309-316, 1973

PLASMÓDIO DE UMA LAGARTIXA, *UROSTROPHUS VAUTIERI* D. & B. (*SAURIA, IGUANIDAE*)*

SAMUEL B. PESSÔA**
PERSIO DE BIASI***

Seção de Venenos — Instituto Butantan

RESUMO — Os autores descrevem uma nova espéce de plasmódio — *Plasmodium vacutieri* n. sp., parasita de uma lagartixa do Estado de São Paulo, *Urostrophus vautieri*, Iguanidae. Esta espécie pertence ao subgênero *Sauramoeba* pois possui esquizontes grandes. Os gametócitos são pequenos e arredondados.

UNITERMOS — Plasmódio de lagartixa, Nova espécie, Haemosporidia, *Urostrophus vautieri*.

INTRODUÇÃO

Há mais de dois anos (abril/71), recebemos uma pequena lagartixa, cuja procedência exata não foi possível ser determinada, tendo-se como único dado disponível a citação de localidade, o Estado de São Paulo.

Apesar das precárias condições de vida em que se encontrava o sáurio, foram feitos, em lâminas, alguns esfregaços do seu sangue, fixados pelo metanol e corados pelo Giemsa (as lâminas assim obtidas foram arquivadas na coleção do Instituto Butantan).

Só agora tivemos ocasião de examinar as lâminas da largatixa em apreço, que foi classificada pelo ilustre Zoólogo, Dr. Paulo E. Vanzzolini, Diretor do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, como sendo um exemplar de *Urostrophus vautieri* (D. & B.). A área de distribuição desta espécie alcança, segundo Peters e Donoso-Barros (1966), o Sul do Brasil e o Norte da Argentina, além do Oeste da Bolívia. Damos adiante a descrição sumária da espécie do plasmódio encontrado no sangue da lagartixa.

Plasmodio da **Urostrophus vautieri**

Garnham (1966) divide os parasitas dos Sáurios do gênero *Plasmodium* em dois subgêneros: espécies com grandes esquizontes (subgênero *Sauramoeba*) e espécies com esquizontes pequenos (subgênero Carinamoeba). A espécie

* Trabalho do Instituto Butantan.
** Bolsista do FEDIB.
*** Chefe da Seção de Venenos do Instituto Butantan.

Endereço para correspondência:
C.P. 65, São Paulo, Brasil.

sui esquizontes grandes. Neste subgênero distinguem-se séries com gametócitos alongados e com gametócitos arredondados; o plasmódio que descrevemos possui gametócitos arredondados.

Não conseguimos identificar o plasmódio deste réptil a nenhuma das outras espécies até hoje descritas em sáurios da Região Neotropical e, por conseguinte, consideramos como nova espécie que denominamos *Plasmodium* (*Sauramoeba*) *vautieri* n. sp.

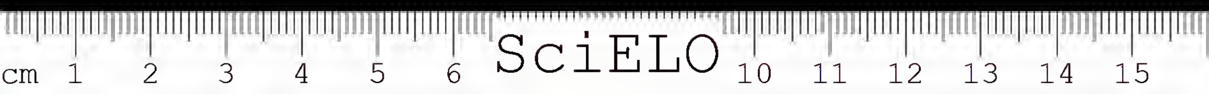
Esquizontes — A menor formação por nós encontrada mostra-se como um corpúsculo ovóide, com um grânulo cromático bem visível e medindo cerca de 2 microns (Fig. 1). O esquizonte posteriormente assume uma forma arredondada, sem haver ainda divisão nuclear, com cromatina periférica e vacúolo bem visível (Figs. 2 e 4, glóbulo da esquerda). Em seguida, o núcleo se divide produzindo 3, 5 e 6 fragmentos nucleares; não há modificação da forma do eritrócito, bem como seu núcleo conserva-se normal, em forma, tamanho e posição na célula (Figs. 3, 4 — glóbulo da direita, e 5). Agora já se percebem grânulos de pigmentos parasitários escuros, que são encontrados no interior da área nuclear.

O esquizonte em divisão ou maduro pode ser arredondado (Figs. 7, 8, 9 — glóbulo superior, e 11 — idem), em forma de leque (Figs. 10 e 12, glóbulo da direita) e apresenta-se ainda alongado, como se vê pelas microfotografias 6, 9 (glóbulo inferior), 13, 14, 15 e 16. Os grânulos escuros do pigmento se acumulam no centro ou em uma das bordas do esquizonte. Os esquizontes maduros que medem de 7 a 10 microns de comprimento, produzem de 10 a 20 merozoítas, que se situam, geralmente, nos polos dos eritrócitos que parasitam; quando a célula é parasitada por dois esquizontes, em geral um se coloca em um dos polos e o outro no polo oposto (Fig. 15, glóbulo inferior).

Neste particular, esta espécie se aproxima de *P. tropiduri*, porém se diferencia por muitos outros aspectos como, tamanho do esquizonte e muito maior número de merozoítas.

Não verificamos distorções da célula hóspede, nem perturbações nucleares, devidas à presença do parasita.

Gametócitos — São raramente encontrados nas poucas lâminas de sangue que tivemos ocasião de examinar. Os gametócitos jovens tem a forma arredondada, medem 4 a 5 microns; o citoplasma condensado nas bordas, determina uma superfície um pouco irregular, sendo que o citoplasma central tomando mal o corante de Giemsa o organismo mostra-se esbranquiçado (Figs. 17 e 18). Os gametócitos masculinos medem de 6 a 8 microns, são arredondados (Figs. 19 e 20) ou ligeiramente ovóides (Fig. 21); seu citoplasma toma mal o corante e os pigmentos formam pequenos grânulos na sua superfície. Quanto aos macrogametócitos ou gametócitos femininos, são maiores, arredondados ou ovóides, medem 9 a 10 microns,, tomam melhor o corante de Giemsa; aparecem assim com o citoplasma azulado e a cromatina visível mostra-se ligeiramente avermelhada e dispersa no citoplasma (Fig. 22) ou mais concentrada (Fig. 23).



PESSOA, S. B. & BIASI, P. — Plasmódio de uma lagartixa, *Urostrophus vautieri* (D. & B.) (*Sauria* — *Iguanidae*).
Mem. Inst. Butantan, 37: 309-316, 1973.

O pigmento é fino e se espalha na superfície do citoplasma do parasita. Os gametócitos femininos e masculinos se colocam geralmente nos polos dos eritrócitos e o núcleo da célula que parasitam não é deslocado, bem como a célula não se apresenta hipertrofiada ou destorida.

Formas exoeritrocíticas — Encontramos um esquizonte exoeritrocítico em um monócito, com duas cromatinas e sem pigmento (Fig. 24); também damos microfotografias de esquizontes exoeritrocíticos fora dos glóbulos vermelhos, no sangue periférico da lagartixa (Figs. 25 e 26) e um outro esquizonte no interoir do citoplasma de um monócito (Fig. 27).

COMENTÁRIOS

Consideramos o parasita que acabamos de descrever como nova espécie do gênero *Plasmodium*, que foi colocado no subgênero *Sauramoeba*, sendo pois denominado *Plasmodium* (*Sauramoeba*) *vautieri* n. s. p. Isto porque, verifica-se que esta é a primeira espécie de plasmódio descrita em *Iguanidae* do gênero *Urostrophus*, encontrado na região Sul do Brasil e no nosso caso, no Estado de São Paulo. Do subgênero *Sauramoeba* foram descritas as seguintes espécies de plasmódio com gametócitos arredondados que nos interessam: *P. tropiduri*, *P. meximanum* e *P. floridense*. O *P. tropiduri* afasta-se da nova espécie que descrevemos por possuir esquizontes menores que esta; foi descrito em Minas Gerais e posteriormente no Paramá, por Lainson e Shaw (1969), na *Mabuya mabuya*. O maior número de merozoítas no *P. tropiduri* parece não passar de 12, sendo porém a média 8. Quanto às duas espécies, verifica-se que o *P. vautieri* n. sp., diferencia-se do *P. floridense*, pois esta espécie apresenta largos vacúolos em todas as formas evolutivas, quer esquizontes ou gametócitos, bem como pelo seu tamanho menor do que a espécie que ora descrevemos. Em relação ao *P. mexicanum*, sabe-se que o gametócito desta espécie determina a distorção dos eritrócitos parasitados e perturbações de seu núcleo.

Quanto a outros, como o *P. diploglossi* e *P. cnemidophorus* separam-se facilmente, pois estes possuem gametócitos alongados e produzem mais de uma centena de merozoítas.

Quanto aos *P. torrealbai*, *P. basilisci*, *P. pifanoi* e *P. balli*, também possuem gametócitos alongados. O *P. rhadinurum* que possui gametócitos arredondados como a espécie que descrevemos, emite prolongamentos citoplásmicos muito típicos.

Várias outras espécies descritas mais recentemente na Zona Tropical, como o *P. gonatodi*, o *P. morulum* (Telford, 1969 e 1970), se diferenciam do *P. vautieri* n. sp., na aparnêcia e nas dimensões.

SUMMARY — The AA. describe a new species of plasmodium of a lizard, *Urostophus vautieri* (Iguanidae), subgenus *Sauramoeba*. The lizard is from the State of São Paulo, and the plasmodium has a large schizont with round gametocytes.

UNITERMS — Lizard's malaria. New species. Haemosporidia. *Urostophus vautieri*.

BIBLIOGRAFIA

A bibliografia sobre Plasmódio dos Sáurios é encontrada na monumental monografia de P. C. C. Garnham 1966): *"Malaria parasites and other hemosporidia"*, 1 Volume, 1.114 páginas, Blackwell Scientific Publication, Oxford.

Aqui citamos os trabalhos mais recentes e que mais nos interessam:

AYALA, S. C. — 1970 — Lizard Malaria in California; description of a strain of *Plasmodium mexicanum* and biogeography of lizard malaria in western North America, *J. Protozool.* 56: 417-425.

HERBAN, N. Z. & COATNEY, S. R. — 1969 — *Plasmodium basilici* from El Salvador — Honduras. *J. Parasitol.* 55: 225-226.

JORDAN, H. B. — 1970 — The ocurrence and development of *Plasmodium mexicanum*, in the western fance lizard *Sceloporus occidentalis*. *J. Protozool.* **17**: 86-89.

LAINSON, R. & SHAW, J. J. — 1969 — New host records for *Plasmodium diploglossi*, *P. tropiduri* Aragão e Neiva, 1909, and *P. cnemidophori* Carini, 1941. *Parasitology* 59: 163-170.

PETERS, J. A. & DONOSO-BARROS, R. — 1970 — Catalogue of the Neotropical *Squamata*. Part. II — Lizards and Amphisbaenians. Smithsonian Institution, United States National Museum, Washington, D. C.

TELFORD, S. R. Jr. — 1969 — A new saurian malaria parasite, *Plasmodium balli* from Panama. *J. Protozool.* **16**: 431-437.

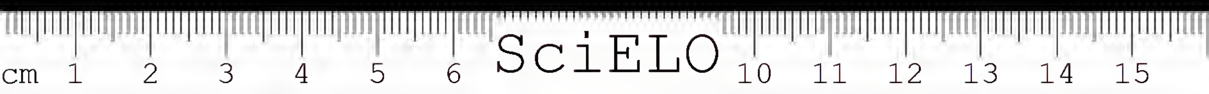
TELFORD, S. R. Jr. — 1970 — Saurian malarial parasites in eastern Panama. *J. Protozool.* **17**: 566-574.

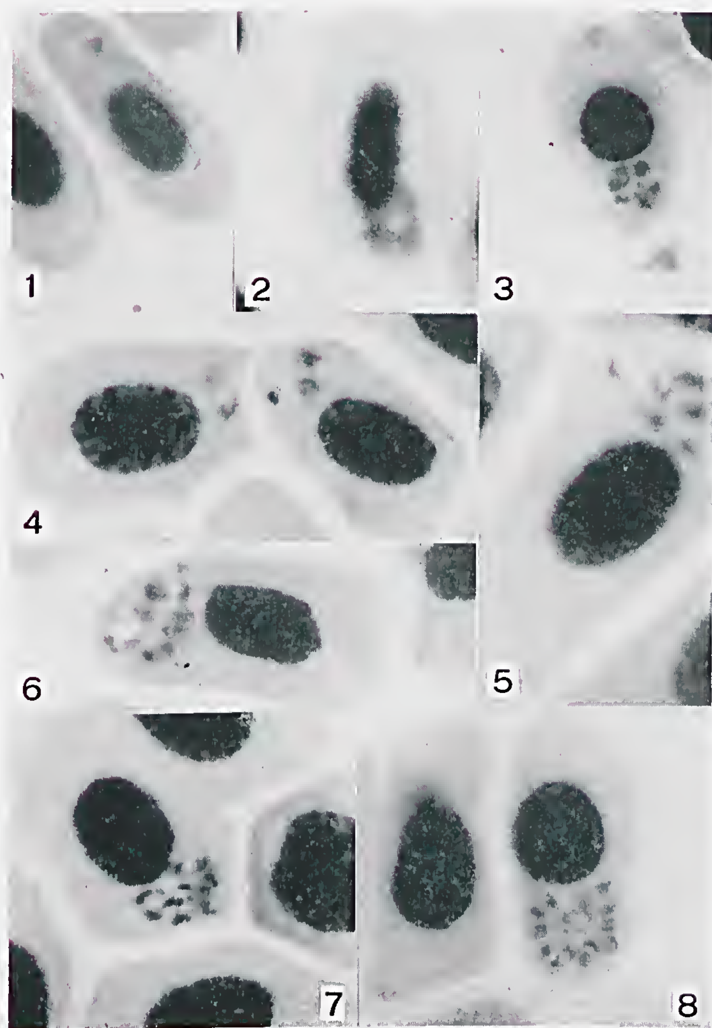
TELFORD, S. Jr. — 1971 — *Plasmodium aurulentum* sp. nov. from the neotropical forest gecko, *Tecadactylus rapicaudus*, in Panama. *J. Protozool.* **17**: 308-311.

TELFORD, S. R. Jr. — 1972 — Malarial parasites of "Jesu Cristo" lizard *Basiliscus basiliscus* (Iguanidae) in Panama. *J. Protozool.* **19**: 77-81.

WALLIKER, D. — 1966 — Malaria parasites of some brazilian lizards. *Parasitology* **56**: 39-44.

Recebido para publicação em 18.VI.73.
Aceito para publicação em 15.IX.73.





Figs. 1 e 2 — Esquizontes jovens.
Fig. 3 — Esquizonte com 6 merozoítas.
Fig. 4 — Eritrócito à esquerda (esquizonte com cromatina periférica e vacúolo); à direita (esquizonte com 3 merozoítas).
Fig. 5 — Esquizonte com 5 merozoítas.
Fig. 6 — Esquizonte alongado com vários merozoítas.
Figs. 7 e 8 — Esquizontes arredondados com 10 a 12 merozoítas.

(Aumentos figs. 1 a 4, 6 a 8: x 2.000; fig. 5: x 3.000)

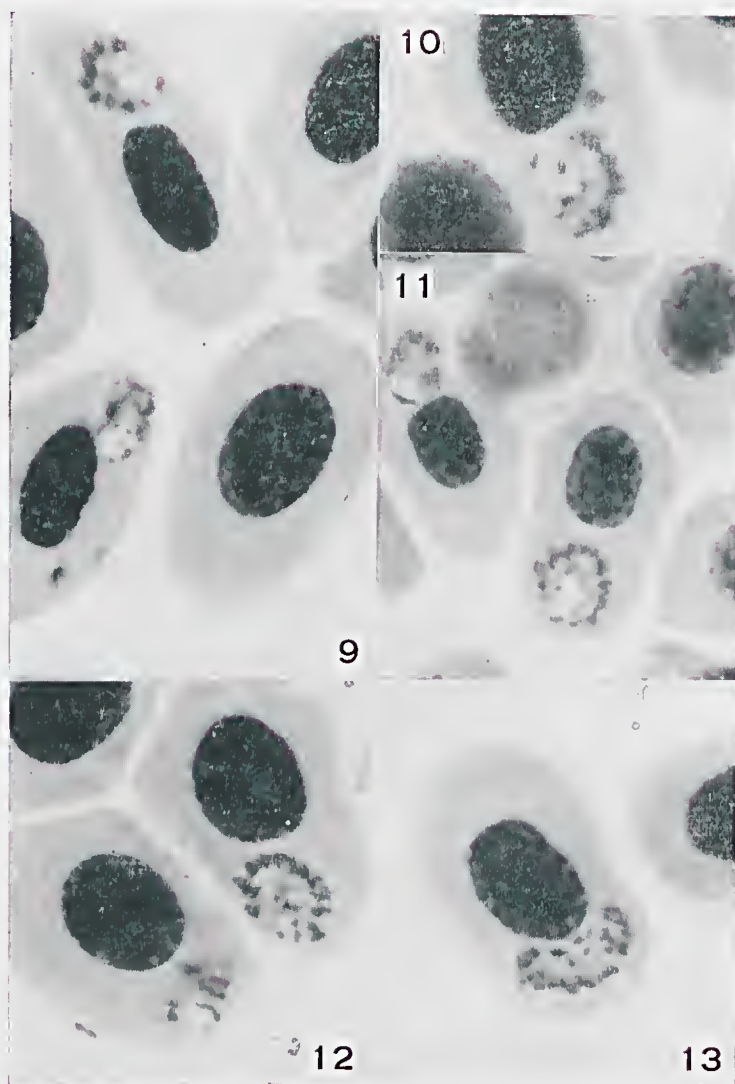


Fig. 9 — Eritrócito superior (esquizonte arredondado com 10 merozoítas); inferior (esquizonte alongado com diversos merozoítas).

Fig. 10 — Esquizonte em leque com mais de 15 merozoítas.

Fig. 11 — Idem (eritrócito inferior); esquizonte em divisão (eritrócito superior).

Fig. 12 — Esquizontes: em leque com 15 merozoítas e jovem com 7 merozoítas.

Fig. 13 — Esquizonte alongado, em leque, com diversos merozoítas.

(Aumentos: x 2.000)

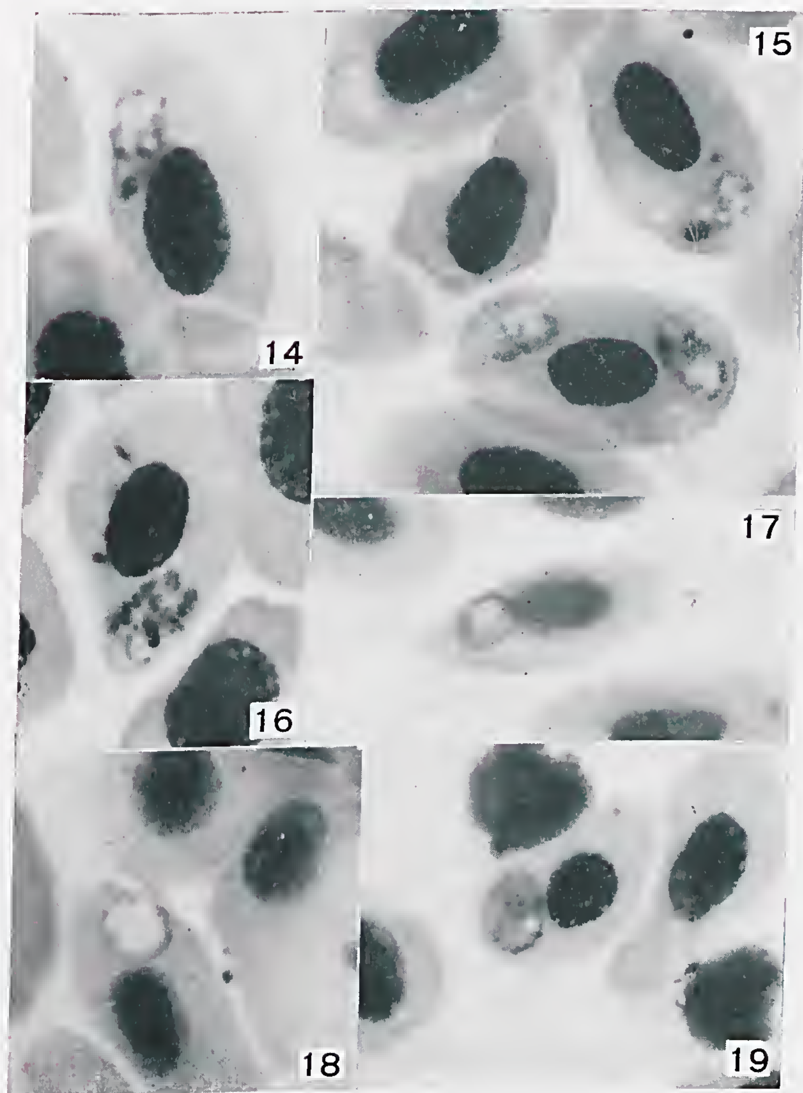
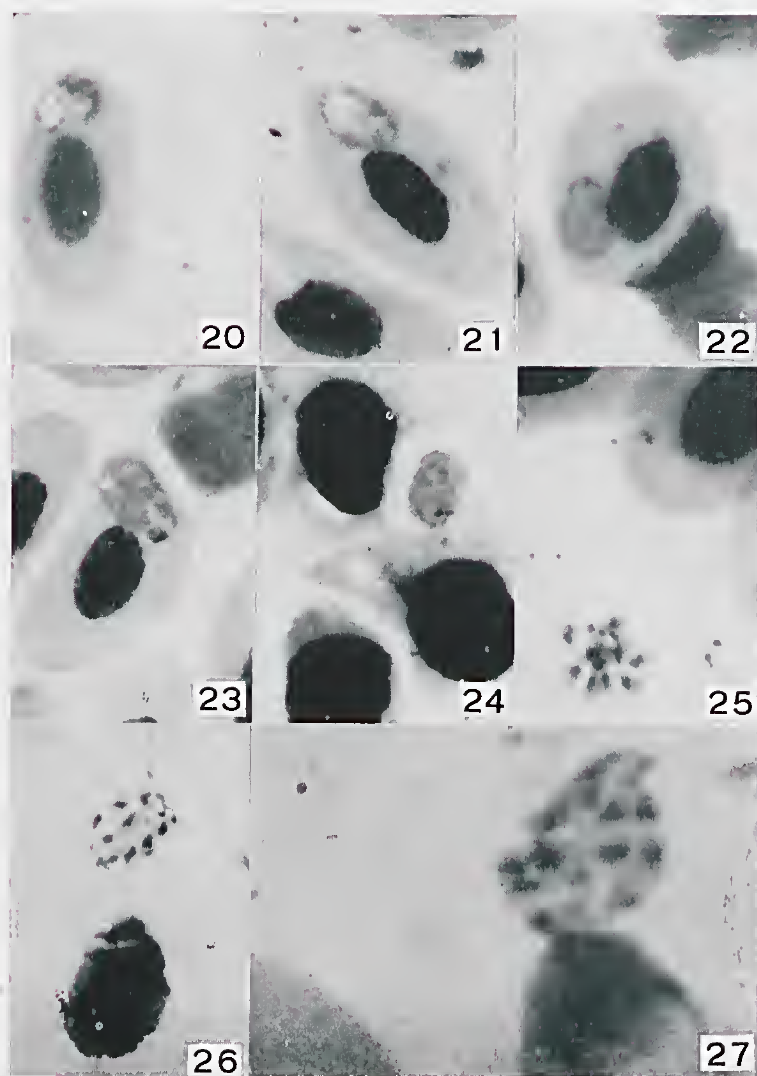


Fig. 14 — Esquizonte alongado, com poucos merozoítas.
Fig. 15 — Eritrócito superior (esquizonte alongado com poucos merozoítas); inferior (com dois esquizontes, sendo um em cada pólo da célula).
Fig. 16 — Esquizonte alongado com 12 merozoítas.
Figs. 17 e 18 — Gametócitos jovens.
Figs. 19, 20 e 21 — Gametócitos masculinos (microgametócitos).

(Aumentos: x 2.000)



Figs. 22 e 23 — Gametócitos femininos (macrogametócitos).
Fig. 24 — Esquizonte exoeritrocítico (em monócito).
Figs. 25 e 26 — Merozoítas exoeritrocíticos, no sangue circulante da lagartixa.
Fig. 27 — Esquizonte exoeritrocítico em monócito.

(Aumentos: figs. 20 a 26 x 2.000 — fig. 27: x 3.000)

Mem. Inst. Butantan
37: 317-325, 1973

AÇÃO LARVI E MOLUSQUECIDA DO "TEGO-51" *

LAURO P. TRAVASSOS FILHO
BRUNO SOERENSEN
THEREZINHA J. H.-FONTENELLE

Seções de Parasitologia e Controle, Instituto Butantan

RESUMO — Observações iniciais, feitas com concentrações de 2,5/1.000 a 1/16.000 de: "Tego-51", portanto bem inferiores às que causariam efeitos tóxicos em camundongos, demonstraram ação letal sobre *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e até 1/8.000 sobre larvas e pupas de *Culex pipiens fatigans* Wied., 1828, além de perturbar a eclosão dos adultos desse mosquito. Todas as concentrações, entretanto, mostram-se letais para os pequenos peixes *Lebistes reticulatus*.

UNITERMOS — Detergente "Tego-51". Ação larvi e molusquecida.

INTRODUÇÃO

Desenvolvendo métodos para combater vectores e invertebrados aquáticos de interesse à Saúde Pública, iniciamos com este trabalho, pesquisas experimentais com substâncias capazes de combater o vector da esquistossomose sem prejudicar as qualidades potáveis das coleções líquidas em que vivem os moluscos planorbídeos.

Tentativas nesse sentido já haviam sido feitas em 1954 por Vallejo-Freire, Ribeiro & Ribeiro [4], empregando compostos amoniacais e experimentando em peixes e moluscos planorbideos.

Os planorbídeos, como moluscos pulmonados, são obrigados a respirar na superfície do meio líquido em que vivem, aí abrindo o pneumostomo, muito embora essa respiração nem sempre obedeça a freqüência rápida, na dependência do teor de oxigenação do líquido. Consideramos então que emprego de substâncias tensoativas, como os detergentes, em concentrações adequadas, traria uma modificação de tensão superficial capaz de, ao envez de permitir a entrada do ar no pneumostomo, facilitasse a entrada da água, afogando o molusco.

Considerando também que, pelo mesmo mecanismo, esse processo serviria ao combate de larvas de culicídeos, com maior e mais imediato interesse no extermínio das larvas de espécies do gênero *Cluex*, por se desenvolverem em

* Trabalho (n. 109, p. 81) apresentado no XVIII Congresso Brasileiro de Higiene, São Paulo, outubro de 1970.

Endereço para correspondência:
C.P. 65, São Paulo, Brasil.



qualquer coleção de água dos ambientes domésticos ou de áreas poluídas, resolvemos também observar se, modificada a tensão superficial, larvas e pupas de mosquitos conseguiriam o ar que veem buscar na superfície dos meios líquidos em que vivem.

As pesquisas foram iniciadas com o "Dodecyl-di (amino-etil) glicina", que é um amino ácido de grande cadeia molecular, anfotensidio conhecido pelo nome de "TEGO-51", com apreciável atividade germicida e baixo nível de toxidez para mamíferos, propriedades bem determinadas por Soerensen, Correa e Zezza Neto, em 1969 [1]

Na Argentina as propriedades bactericidas foram experimentadas na preservação do leite para consumo público, por Mazza, Landolfi e Montes, em 1970[2], mas seu emprego foi abandonado por produzir muita espuma pela agitação no transporte.

As nossas observações foram feitas buscando-se o limite mínimo de toxidez para planorbídeos, larvas e pupas de culicídeos e também para peixes, uma vez que o combate aos planorbídeos deve ser feito inclusive em reservatórios onde, eventualmente, também são criados peixes de interesse econômico.

As experiências iniciais, feitas com concentrações as maiores sem efeitos tóxicos para camundongos, demonstraram logo a ação esperada, ainda mais, relativamente aos culicídeos, também pareceram os adultos saidos de pupas colocadas já maduras nas soluções testes, isso porque, não conseguindo os mosquitos apoio na superfície da água, dada a baixa da tensão superficial pelo detergente, naufragavam espetacularmente.

Contudo a ação tensoativa mostrou-se muito tóxica para peixes, provavelmente interferindo no sistema de trocas metabólicas ao nível das branquias, e os peixinhos *Lebistes*, mesmo nas concentrações mínimas empregadas logo se mostravam inquietos, perecendo em prazos curtos.

Damos em seguida os resultados obtidos nas diversas concentrações de "TEGO-51" relativos ao molusco planorbídeo *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1853), vector da esquistossomose, à larvas, pupas e adultos do mosquito comum *Culex pipiens fatigans* Wied., 1828 e também de pequenos peixes *Lebistes reticulatus*.

MATERIAL

Com vistas aos vectores da esquistossomose, foram empregados exemplares com cerca de 10 mm de diâmetro do planorbídeo *Biomphalaria tenagophila*.

Vizando o combate aos culicídeos, empregamos larvas e pupas do mosquito comum, *Culex pipiens fatigans*; as larvas foram selecionadas entre as mais desenvolvidas do último estádio, condição importante por termos verificado que, quanto menores mais sensíveis e poderiam mascarar os resultados.

As experiências com as pupas desse *Culex* foram feitas tanto com as recém-pupadas, de colorido claro, como as de evolução mais adeantada, até as pré-adultas, de colorido preto, mostrando todas elas o mesmo comportamento.

Nas observações com peixes foram empregados ♂ adultos de *Lebistes reticulatus,* com cerca de 25 mm de comprimento e com bastante tempo de vida nos tanques de criação.

Esses peixinhos foram testados separadamente porque, sendo predadores eficientes de larvas de mosquitos, antes de sentirem os efeitos do detergente atacavam e devoravam as larvas dos culicídeos.

MÉTODOS

Foram empregados frascos cilíndricos de vidro neutro, com cerca de 10,5 cm de diâmetro, nos quais o volume de 1000 ml correspondente a uma coluna líquida de 12 cm.

Foi empregada para as soluções água de grande tanque, onde habitualmente são criados moluscos pulmonados e peixes *Lebistes,* dando-se aos animais de prova o mesmo meio ambiente.

Utilizamos 8 frascos para as provas, sendo o primeiro deixado com as testemunhas, e os seguintes com a concentrações decrescentes de "TEGO-15": 2,5/1.000 — 1/1.000 — 1/2.000 — 1/4.000 — 1/8.000 — 1/16.000 — 1/20.000.

A primeira concentração, 2,5/1.000 (=0,25%), foi empregada como teste de concentração excessivamente alta, porém ainda sem efeitos tóxicos para camundongos, como controle de tempo de morte dos animais observados.

Numa primeira tentativa de observação simultânea, foram dispostos 8 frascos com 500 ml de água em cada um, a metade do volume pretendido; nesse volume foram colocados os animais de provas a saber, larvas e pupas de *Culex* e os planorbídeos.

Após vinte minutos de espera, para uma boa adaptação ao novo ambiente, eram acrescentados os restantes 500 ml de água em cada frasco, com o dobro da concentração de "TEGO-51", pois com isso completávamos o volume de 1.000 ml e a concentração desejada para cada experiência.

Essa segunda parte do líquido era acrescentada lentamente por meio de fino tubo plástico no fundo do frasco de prova, sendo evitada qualquer agitação, para que a difusão se fizesse lentamente.

Todavia esse processo, além de trabalhoso e lento, apresentou o inconveniente dos animais de prova nadarem na parte de concentração dupla antes da mistura se tornar homogenea, levando a resultados pouco significativos. Por isso a técnica foi modificada para muito mais prática, tanto no preparo dos líquidos, como possibilitando a observação imediata dos resultados em todas as concentrações e com os mesmos fatores de ambiente.

Nessa segunda fase as soluções com as diversas percentagens de "TEGO-51" foram preparadas diretamente nos frascos de prova, bem agitadas para perfeita mistura e deixadas em repouso por 24 horas, possibilitando a mesma temperatura em todos os recipientes, o que era controlado nos termômetros de cada um.

Verificada a uniformidade de temperatura nos recipentes, eram então colocados em cada frasco os animais testes, simultâneamente, pois esses animais

também já haviam sido previamente separados em frascos correspondentes a cada prova, apenas em volume mínimo de água, que completou o volume total quando juntada. Isso permitiu se observar e comparar de imediato o que acontecia nas diversas concentrações e feitos os respectivos registros.

Houve necessidade de serem observações simultâneas para que as leituras fossem feitas na mesma temperatura; as variações de ação do "TEGO-51" em relação a temperatura do meio líquido serão objeto de pesquisas futuras.

Durante as observações com pupas maduras de *Culex*, verificamos que os adultos ao eclodirem não conseguindo sobre o filme de água da superfície a estabilidade necessária para o desenvolvimento e endurecimento de suas estruturas, apoio que faltava devido a ação tensoativa do "TEGO-51", naufragavam de maneira expetacular. Para estas observações foram então usados cristalizadores de maior diâmetro para maior superfície às pupas, mas os resultados foram os mesmos que os primeiros observados nos frascos das demais provas.

Devido a excassez de animais para testes, as verificações de durabilidade de ação tóxica do "TEGO-51" tiveram que ser deixadas para outra oportunidade; podemos entretanto adiantar que as mesmas soluções usadas nas provas iniciais, ainda apresentavam ação larvi, molusco e ictiocidas cerca de vinte dias após o primeiro uso. Esse efeito residual, de grande importância no combate, inclusive sob o ponto de vista econômico, será objeto de pesquisas futuras, na dependência de melhores instalações, em andamento.

RESULTADOS

(Tabela única)

Biomphalaria tenagophila (Orbigny, 1835).

Colocados os exemplos deste planorbídeo na solução de "TEGO-51" a 2,5/1.000, a morte é imediata. O molusco retrai-se na concha definitivamente, expelindo líquido amarelo por algum tempo.

Nas soluções a 1/1.000 e 1/2.000 o comportamento é quase semelhante; há uma imediata retração para dentro da concha, e apenas podem ser vistos, à lupa, lentos movimentos dos tentáculos, que cessam completamente após 80 e 120 minutos, respectivamente.

Na solução a 1/4.000, o molusco demonstra de início, forte reação ao detergente, retraindo-se na concha; posteriormente tenta, sem êxito, locomover-se pelo fragmento de folha de alface, sua alimentação predileta, colocado como estímulo ou então tenta deslocar-se pelas paredes do frasco tentando chegar a superfície do líquido.

Ao fim de 3 a 4 horas fica semiretraido na concha, com movimentos lentos dos tentáculos, que cessam ao fim de 18 horas, quando foram considerados mortos.

Idêntico procedimento foi registrado nas concentrações de 1/8.000 e 1/ /16.000, variando apenas o período de vida, o qual foi de 20 e 24 horas respec-

tivamente. É interessante assinalar que, embora a concentração de "TEGO-51" fosse o dobro, 1/8.000 e 1/16.000, a diferença de prazo até a morte foi mínima, apenas de 4 horas.

A última observação foi feita com concentração de 1/20.000; após 27 horas de permanência nessa solução, os moluscos se achavam no fundo do frasco, semi-retraídos nas conchas e apresentando movimentos perceptíveis apenas à lupa estereoscópica.

Larvas de *Culex pipiens fatigans* Wied., 1828

Nas soluções mais fortes, 2,5/1.000 e 1/1.000, as larvas desse mosquito mostram logo sinais de intoxicação; na mais concentrada morreram dentro de 160 minutos e, na solução seguinte morreram em 48 horas.

As larvas maduras mostraram-se bem resistentes ao "TEGO-51", só morrendo, afora as duas primeiras soluções citadas, nas de 1/2.000, 1/4.000 e 1/8.000, ao fim, respectivamente de 3, 5 e 7 dias. Há porém uma nítida intoxicação pois, não só deixam de se alimentar, como interromperam o desenvolvimento, nenhuma atingindo a fase de pupa na concentração de 1/2.000, e as poucas que se transformaram em pupas morreram nessa fase nas concentrações seguintes (1/4.000 e 1/8.000).

Larvas maduras de *C. p. fatigans* colocadas em soluções de "TEGO-51" a 1/16.000 e 1/20.000 evoluíram normalmente, passando a pupas e estas a adultos, que voaram.

Pupas de *Culex pipiens fatigans* Wied., 1828

As pupas desses mosquitos mostraram reações inesperadas no "TEGO-51", sendo muito mais sensíveis ao detergente que as larvas; isso pode ser explicado pelo metabolismo mais intenso que ocorre na fase pupal, em que praticamente só ficam na superfície, com as duas tubas respiratórias em contacto com o ar, o que é dificultado pela ação tensoativa do detergente, levando-as a afogamento mais rápido que as larvas. As observações foram feitas sempre com pupas claras, para permitir maior tempo de observação antes de passarem a adultos.

Nas soluções a 2,5/1.000, e 1/1.000, a morte das pupas verificaram-se em 90 e 150 minutos respectivamente; tão logo eram colocadas nas soluções, ficavam irriquietas, perdendo a motilidade pouco a pouco até ficarem mortas no fundo do frasco. Nas soluções a 1/2.000 e 1/4.000 morreram todas em cerca de 48 e 55 horas, respectivamente.

Nas concentrações de 1/8.000 e 1/16.000, os resultados foram semelhantes, com diferença de horas, morrendo as pupas respectivamente em 60 e 72 horas.

Na concentração de 1/8.000, de algumas pupas eclodiram adultos os quais, face a ação do detergente, não conseguiram voar. Na concentração de 1/16.000 alguns adultos dos eclodidos conseguiram voar, outros não.

A concentração de "TEGO-51" a 1/20.000 não se mostrou tóxica para pupas desse culicídeo, todas evoluíram até adultos, que voaram.

Adultos de *Culex pipiens fatigans* Wied., 1828

Pupas já bem evoluídas, com a cor preta característica, quando colocadas em soluções de "TEGO-51" até a concentração de 1/8.000, na maioria morrem como já foi comentado.

Entretanto, como os mosquitos para bem eclodir dos puparios necessitam de apoio na superfície líquida, os que eclodiram na solução a 1/8.000 naufragaram justamente por lhes faltar o apoio habitual da tensão superficial, modificada pelo detergente, muitos naufragando ainda presos ao próprio pupário.

Na solução a 1/16.000 muitos adultos naufragaram, poucos conseguiram voar.

A fotografia 1 mostra a superfície da solução de "TEGO-51" a 1/8.000, vendo-se os mosquitos naufragados, alguns ainda presos aos respectivos pupários.

A fotografia 2, em outro frasco com mais exemplares, além de muitos mosquitos naufragados, larvas e pupas ainda respirando na superfície e, ao fundo, como sombras por estarem abaixo do plano focal da superfície, pupas mortas, em posição típica que assumem, como que esticadas para trás, posição oposta a de "vírgula" que apresentam quando vivas.

Peixes *Lebistes reticulatus*

Morrem rapidamente na concentração de 2,5/1.000; nas concentrações de 1/8.000 e 1/16.000 resistem apenas 38 minutos. Não foi observado na concentração de 1/20.000.

Voltaremos, em pesquisas futuras, a observar o comportamento de peixes em soluções ainda mais diluidas de "TEGO-51" quando, inclusive, estudaremos a ação do detergente em peixes maiores que *Lebistes*.

SUMMARY — Initial observations made with concentrations of 2,5/1.00 to 1/16.000 of "Tego-51", hence much low-er-than such as would cause toxic effects in mice, showed lethal action on *Biombhalaria tenagophilia* (Orbigny, 1835); concentrations of 1/8.000 had the same effect on larvi and pupae of *Culex pipiens fatigans* Wied, 1828, besides disturbing the eclosion of adults of this mosquito. All concentrations, however, were lethal to the small fish *Lebistes reticulatus*.

UNITERMS — Larvicidals. Moluscicidals. "Tego-51".

TABELA ÚNICA

CONCENTRAÇÕES DE TEGO-51

	Controle	2,5/1000	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	1/20000
Biomphalaria tenagophila	Comportamento e evolução normais durante 10 dias de observação.	morte imediata	morte até 1h,20′	morte até 2hs	morte até 18hs	morte até 20hs	morte até 24hs	após 27hs doentes no fundo
Larvas de *Culex*		morte até 2hs,40′	morte até 48hs	morte até 72hs	morte até 120hs	morte até 168hs	sem efeito	sem efeito
Pupas de *Culex*		morte até 1h,30′	morte até 2hs,30′	morte até 48hs	morte até 54hs	morte até 60hs	morte até 72hs	sem efeito
Lebistes reticulatus ♂		morte imediata	morte até 20′	morte até 24′	morte até 30′	morte até 38′	morte até 38′	

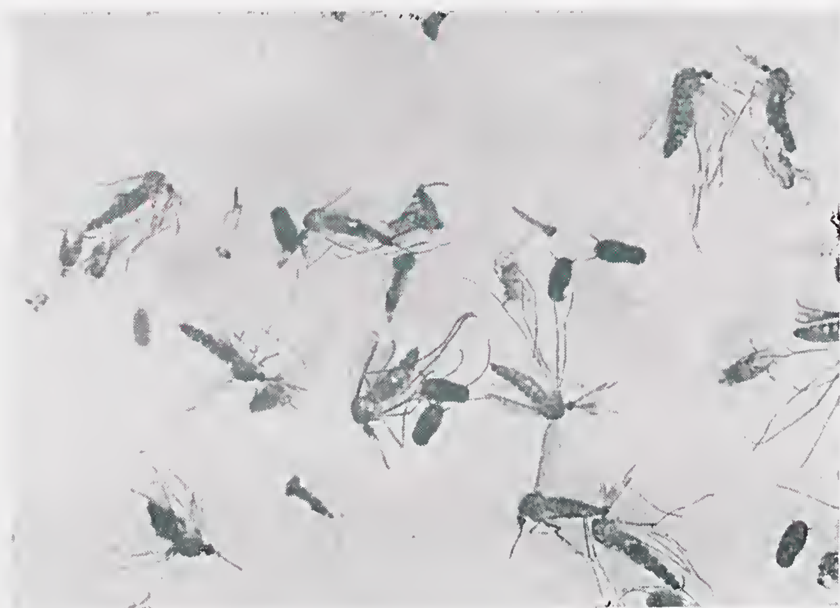


Foto 1 — Mosquitos *Culex p. fatigans* afogados após a eclosão em solução de "TEGO-51" a 1/8.000.

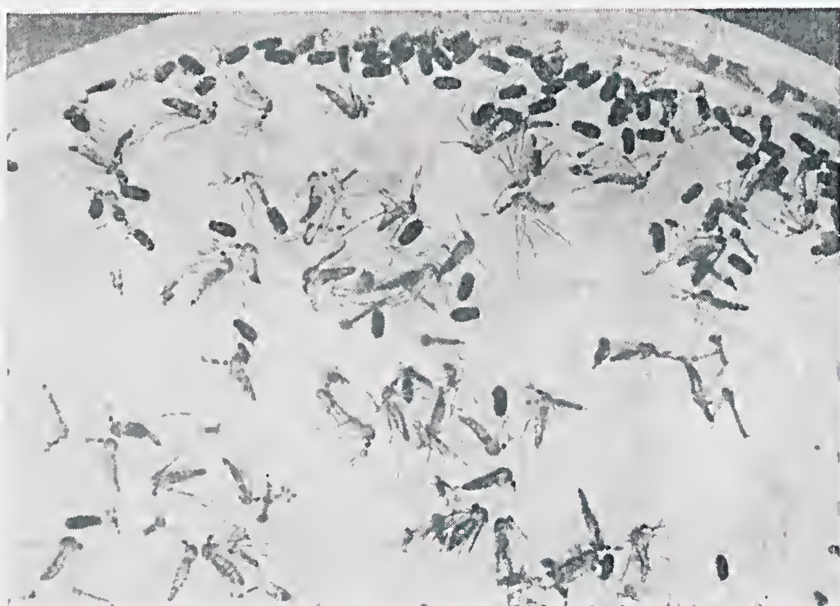


Foto 2 — *Culex p. fatigans*: larvas e pupas vivas respirando na superfície da solução de "TEGO-51" a 1/8.000. No fundo, já mortas, pupas na posição típica de afogamento. Na superfície adultos de ambos os sexos (ver as antenas) mortos ao eclodirem, alguns naufragando ainda presos aos respectivos pupários.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao então Serviço de Erradicação da Malária, da Secretaria da Saúde Pública, em S. Paulo, o fornecimento semanal de centenas de larvas e pupas identificadas de *Culex pipiens fatigans*, o que nos permitiu experiências sucessivas com farto material.

As reações dos animais de provas, para controle do tempo exato da colocação deles na solução até a morte, principalmente nos planorbídeos que ficavam logo quase imóveis, movendo apenas lentamente os tentáculos, foram acompanhados sob lupa estereoscópica Zeiss IV, adquirida com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas, GB, concedido a um dos autores.

As fotografias apresentadas foram feitas com aparelhagem fotográfica adaptada àquela lupa, gentilmente emprestada pela Firma C. Zeiss, SP, a quem agradecemos a colaboração.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MAZZA, D. de, LANDOLFI, M. R. & MONTES, A. L. — Ensayos sobre la acción biocida del Tego-51. *An. Soc. Ci. Argentina*, 189(1-2): 3-10, 1970.
2. SOERENSEN, B., CORREA, H. S. & ZEZZA NETO, L. — O uso do TEGO-51 nas indústrias alimentícias de origem animal — Toxidez e ação antibacteriana. *O Biológico, SP*, 35 (1): 3-7, 1969.
3. TH. GOLDSCHMIDT A.-G. CHEMISCHE FABRKEN, Essen, Alemanha: Folhetos referentes a composição e emprego do Tego-51.
4. VALLEJO-FREIRE, A., RIBEIRO, O. F. & RIBEIRO, I. F. — Quaternary Ammonium Compounds as Molluscacides. *Science*, 119 (3093): 470-472, 1954.

Recebido para publicação em 24.X.1973.
Aceito para publicação em 06.XI.1973.




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

Mem. Inst. Butantan
37: 327-333, 1973

HEMOGLOBIN IN MITOCHONDRION-LIKE ORGANELLES OF IMMATURE CHICK EMBRYO ERYTHROCYTES

J. R. R. COIRO
A. BRUNNER JR.
M. L. SCHWANTES
A. R. SCHWANTES

Laboratório de Microscopia Eletrônica, Instituto Butantan,

SUMMARY — Thin sections of chick proerythrocytes show in their interior the presence of mitochondrion-like organelles (MLO) containing a considerable number of dense granules identical to the particles within the hemoglobinized cytoplasm, suggesting that the content of these organelles are hemoglobin molecules.

Electrophoresis of the supernatant from the lysed MLO fraction in polyacrilamide gel confirmed the presence of hemoglobin, however with a higher migration rate than that of the cytoplasm from proerythrocytes. The authors propose the term "hemosome" for these organelles.

UNITERMS — Hemoglobin in mitochondrion-like organelles.

INTRODUCTION

Hemoglobin biosynthesis in immature chick erythrocytes is not related to the nucleus but to the basophilic sytoplasmic reticulum (9). Furthermore, hemoglobin biosynthesis was found to be proportional to the amount of the basophilic reticulm or "Substantia granulo-filamentosa" (7). Through thin sections and in hemolysed smears of supravitally stained mammalian reticulocytes, it was shown that the filamentous mitochondria are one of the constituents of the "Substantia granulo-filamentosa" (1). Besides mitochondria, however, reticulocytes contain other organelles. Since neither DNA nor aspects suggesting division have been detected yet, the term mitochondrion-like organelles (MLO) was proposed on account of their structural similarity to mitochondria. Recently, the term hemosome was suggested for these organelles because very probably the final hemoglobin biosynthesis takes place in the MLO (3).

This report is meant to show that immature chick erythrocytes, or proerythrocytes, contain the same MLO as found in mammalian immature erythrocytes.

This research has been supported by the Conselho Nacional de Pesquisas, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and Fundo Especial de Depesas do Instituto Butantan.

Address: C.P. 65, São Paulo, Brasil.

MATERIALS AND METHODS

Blood was obtained from 16-day-old chick embryos by cardiac puncture. Supravital staining with brilliant cresyl blue showed that the peripheral blood contains mostly erythroblasts and procrythrobasts. For electron microscopic examination, blood was fixed according to the following procedures: a.) directly in 1.0% osmium tetroxide in phosphate buffer, pH 7.3 during 30 min; b.) directly in 1.5% glutaraldehyde in phosphate buffer, pH 7.3, during 1 h, followed by osmium tetroxide fixation (15 min), after three washings in the buffer, uranyl acetate staining (30 min), dehydration, and embedding, in Polylite 8001 (4,5). Thin sections were obtained in a Porter-Blum MT-1 microtome, stained by lead citrate (10), and photographed in an Elmiskop I electron microscope at 60 and 80 Kv with magnifications from X 8,000 to X 40,000.

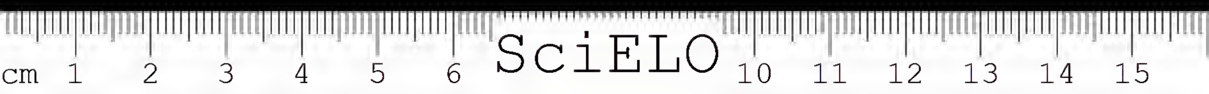
The presence of hemoglobin within the MLO has been demonstrated by electrophoresis. Blood cells from 30 16-day-old chick embryos as well as from 6 newborn chicks were submitted to fractionation, the MLO isolated and lysed according to the following procedure: 1. Blood is poured on 18 ml of a 0.153M NaCl, 0.005M KCl, 0.005M $MgCl_2$, 0.006M $NaHCO_3$, 0.0014M EDTA and 0.05M phosphate buffer (pH 7.2). 2. Centrifugation of the cell suspension for 10 min at 200Xg, discarding of the supernatant, and resuspension of the sedimented cells (1.0 — 1.3 ml) in ten-fold their volume of a 0.32M sucrose and 0.04M phosphate buffer. 3. Homogeneization in a Potter-Elvehjem tube at 1,000 rpm for 4 min at 4°C. 4. Centrifugation of the homogenate at 1,350Xg for 10 min. 5. Centrifugation of the 1,350Xg supernatant at 26,360Xg for 10 min at 4°C. 6. Resuspension of the nuclei-free MLO sediment in 0.32M buffered sucrose and five washings of the fraction by sucessive resuspensions and centrifugations at 26,306Xg for 10 min. The sediment was lysed by resuspension in 3.0 ml distilled water. 7. The suspension was centrifuged at 30,000Xg, for 20 min., after the lysis was completed, and the supernatant was used for electrophoresis.

Supernatants of the lysed MLO and of the last washing medium were concentrated about 10-fold in a vacuum chamber, and then submitted to electrophoresis. Diluted hemoglobin obtained from the supernatant of the 26,360Xg centrifugation (step 5) was used for comparison through this method.

Samples were run on disc electrophoresis in polyacrylamide gel, according to Dietz and Lubrano (6). A 2.5mA current per tube was applied for 40 min at 5°C, and the hemoglobin band was identified by benzidine or ortodianizidine reagents.

RESULTS AND DISCUSSION

The general aspect of chik proerythrocyte cytoplasm, with regard to its high electron density due to hemoglobin molecules, is similar to that of mamma-



lian reticulocytes. Polyribosomes, responsible for globin synthesis, are present from the monomer to the heptamer forms, as found in mammalian reticulocytes (11). The MLO, constituted by lamellae in transversal, oblique or longitudinal disposition, are highly electron dense, generally more than the hemoglgobinized cytoplasm. These three types of lamellae disposition may de found in one and the same organelle (Fig. 1a).

At higher magnifications, MLO show dense particles dispersed within the interlamellar space, presenting 90 to 100 A in diameter. These particles are identical to the particles in the cytoplasm; they are, houwever, more agglomerated in the MLO, thus conferring to the organelles a higher electron density at some regions (Figs. 1b).

Through disc electrophoresis on polyacrylamide gel of the supernatant from the lysed MLO fraction, at least two hemoglobin bands were obtained, resembling those from the supernatant of the 26.360Xg centrifugation, which contain the cytoplasmic hemoglobin of proerythrocytes. The former showed, however, a higher migration rate than the latter (Fig. 2). The second MLO hemoglobin band has a migration rate corresponding to that of the first cytoplasmic hemoglobin band. One of the three hemoglobin types thus found is common to the cytoplasm and the MLO.The last washing supernatant showed no visible band at all, indicating that no contamination of the MLO by the cytoplasmic hemoglobin occurred.

These results suggest that the final hemoglobin biosynthesis, or combination of globin with heme, occurs within the MLO, in the same way as it might happen within the MLO of mammalian reticulocytes (3). Iron-containing material is incorporated by the immature erythrocytes through pinocytosis, or in erythroblasts by rhopheocytosis (8), and is then enveloped by membranes resembling the smooth endoplasmic reticulum problably with the presence of globin while the ferruginous material is transformed for heme synthesis (Fig. 3a); this whole gives rise to a pro-MLO which originates the MLO (2) (Fig. 3b). Since the MLO of chick proerythorcytes seem to play a role in hemoglobin biosynthesis, they may be termed hemosome, as suggested for the MLO of mammalian immature erythrorocytes (3).

RESUMO — Cortes finos de proeritrócitos de ave mostram a presença de organelos semelhantes a mitocôndrios (OSM) contendo um considerável número de grânulos densos, idênticos às partículas encontradas no citoplasma hemoglobinizado, sugerindo serem as partículas no interior dos organelos, moléculas de hemoglobina.

A eletroforese do sobrenadante do lisado da fração OSM, em gel de poliacrilamida, confirmou a presença de hemoglobina, porém, com velocidade de migração superior a da hemoglobina citoplasmática dos proeritrócitos. Os autores propõem o termo hemossomo para os OSM.

UNITERMOS — Hemoglobina em organelos semelhantes a mitocôndrios.

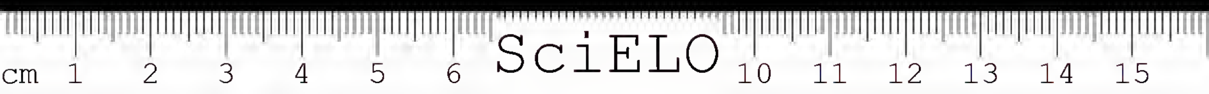
ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Mrs. Vera Mondin Weisz, Mr. Alipio Silva Gonzales and Mr. Heitor Costa for their excellent technical assistance. And Mrs. Sibylle Heller for her editorial aid and translation.

REFERENCES

1. BRUNNER JR., A. — A Estrutura Intrarcticulocitária. *Mem. Inst. Butantan*, **30**: 15-26 (1962).
2. BRUNNER JR., A. & MOMBRUM, I. C. — Genesis of Mitochondrion-Like Organelles in Reticulocytes of Rabbit-Embryo Blood. *Ciência e Cultura*, 24(5): 448-451 (1972).
3. BRUNNER JR., A., SCHWANTES, A. R., SCHWANTES, M. L. & BEÇAK, W. — Hemoglobin in Immature Erythrocyte Mitochondrion-Like Organelles. *Experientia*, **28**: 589-571 (1972).
4. COIRO, J. R. R., WEIGL, D. R., KISIELIUS, J., MENEZES, H. & BILOTTA, J. A. T. — A New Embedding Medium (Polylite 8001) for Biological Material. *Ciência e Cultura*, **31**(7): 660-662.
5. COIRO, J. R. R. & BRUNNER JR., A. — Polylite 8001: A New Embedding Medium for Electron Microscopy. *Rev. Micros. Electr.* **1**(1): VB (1972).
6. DIETZ, A. A. & LUBRANO, T. — Separation and Quantitation of Lactic Dehydrogenase Isoenzymes by Disc Electrophoresis. *Anal. Biochem.* **20**: 246-257 (1967).
7. JENSEN, W. N., ASHENBRUKER, H., CARTWRIGTH, G. E. & WINTROBE, M. M. — The Uptake "in vitro" of Radioactive Iron by Avian Erythrocytes. *J. Lab. Clin. Med.*, **42**: 833 (1953).
8. POLICARD, A. & BESSIS, M. — Sur un Mode D'incorporation des Macromolécules par la Cellule, Visible au Microscope Électronique: La Rhopheocytose. *C. R. Acad. Sci.*, **246**: 3194-3197 (1958).
9. REIMAN, F. — Retikúläre Substanz und Haemoglobinbildung. *Schweiz. Z. Path.*, **6**: 35 (1943).
10. REYNOLDS, E. S. — The Use of Lead Citrate at High pH as an Electron Opaque Stain in Electron Microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**: 209 (1963).
11. WARNER, J. R., RICH, A. & HALL, C. E. — Electron Microscope Studies of Ribosomal Clusters Synthesizing Hemoglobin. *Science*, **138** (3548): 1399-1404 (1962).

Recebido para publicação em 26.X.1974
Aceito para publicação em 26.XI.1974



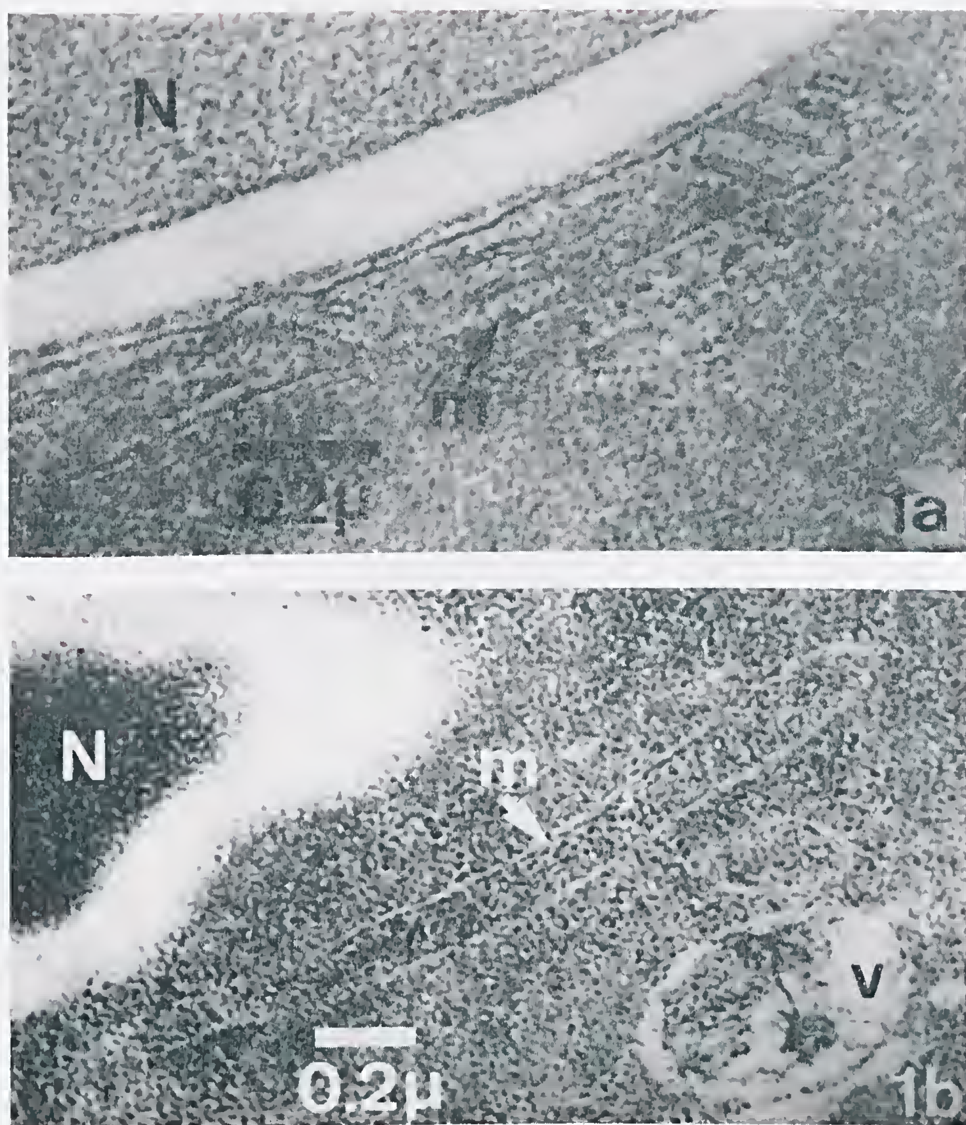


Fig. 1 — Thin sections of chick-embryo proerythrocytes. The nuclei (N) are retracted due to the fixation.

a) With a mitochondrion-like organelle (m) constituted by lamellae in oblique or longitudinal dispositions.

b) Containing an electron-dense mitochondrion-like organelle (m) completely filled with particles identical to the ones of the hemoglobinized cytoplasm; the transverse or oblique lamellae are hardly visible. V — vesicle.

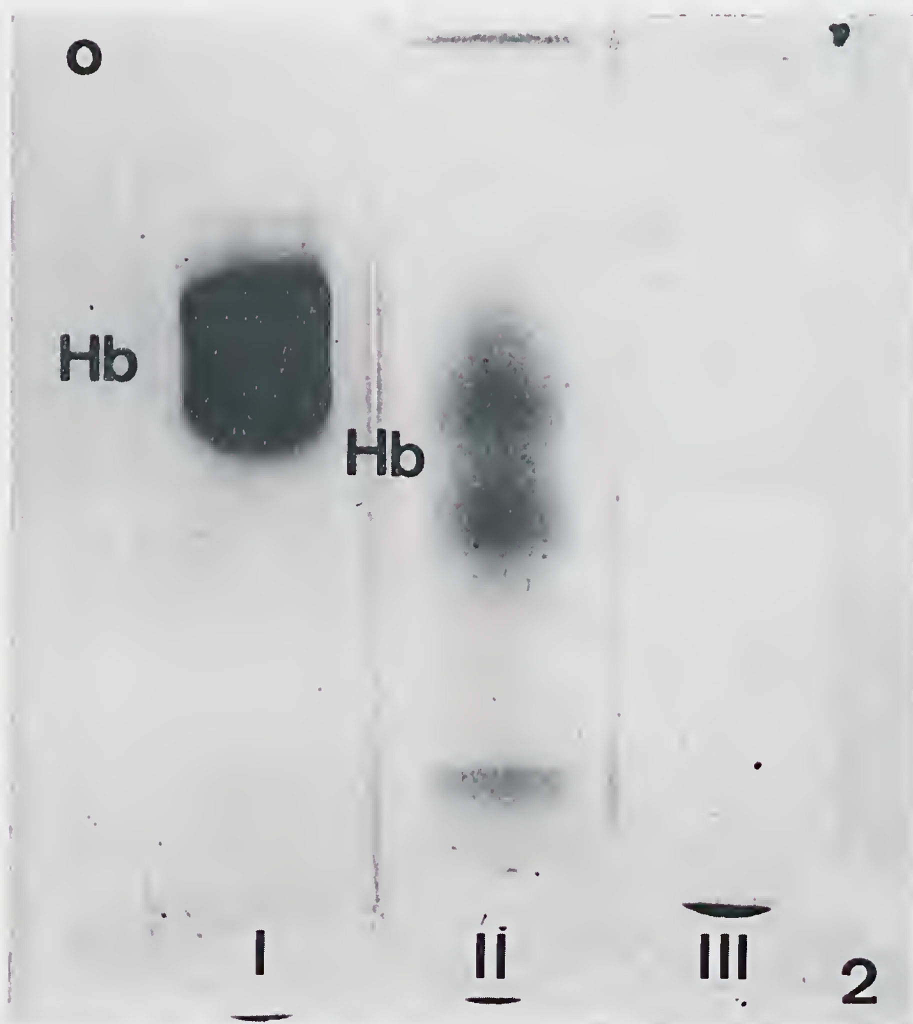


Fig. 2 — Electrophoresis patterns of hemoglobin from the supernatant of 26,350Xg centrifugation (cytoplasmic hemoglobin (I) and from mitochondrion-like organelic content (II); *o* — origin; *Hb* — hemoglobin bands; the last washing supernatant shows no visible bands (III).

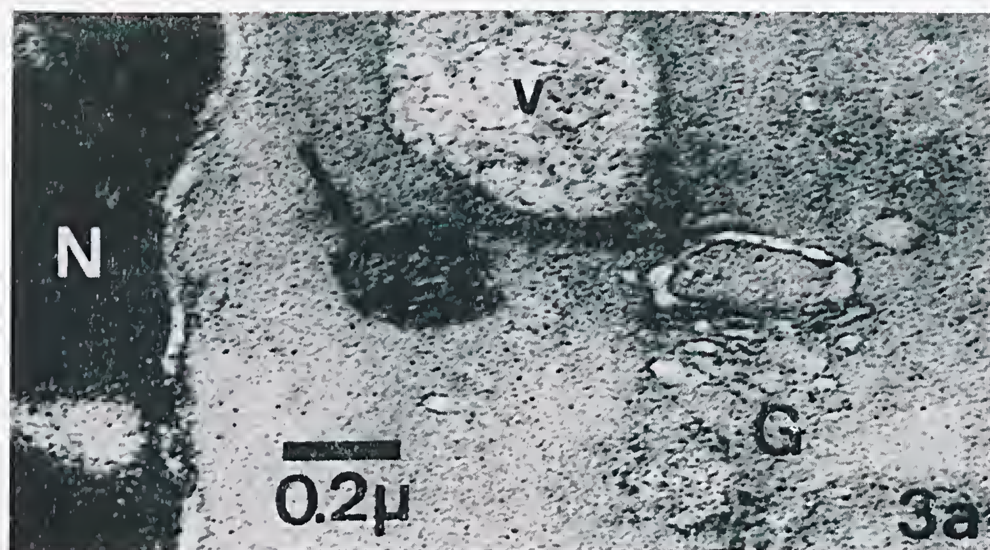
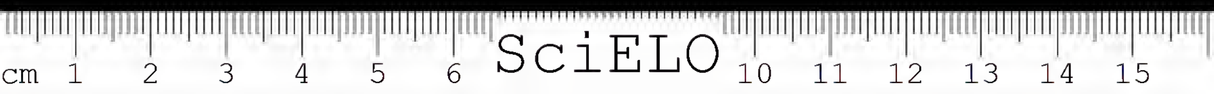




Fig. 3 — Thin sections of proerythrocytes.

a) An electron-dense material is enveloped by the smooth endoplasmic reticulum (*arrow*). Remnants of the Golgi complex (*G*) and a vesicle (*V*) are seen. *N* — nucleus.

b) Organelles identical to pro-hemosome (*ph*), and hemosome in development (*h*), of mammalian reticulocytes are observed. *V* — empty vesicle.


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

Mem. Inst. Butantan
37: 335-344, 1973

HEMOSOME AND HEMOGLOBIN BIOSYNTHESIS IN EMBRYOS AND IN REGRESSIVE ANEMIAS

A. BRUNNER JR.
J. R. R. COIRO
M. L. SCHWANTES
A. R. SCHWANTES

Laboratório de Microscopia Electrônica, Instituto Butantan,

SUMMARY — Hemosomes are organelles. Which increase in number at the reticulocytary stage in the peripheral blood of embryo-rabbits, and of adult humans and guinea-pigs in hemolytic regressive anemias. Through fractionation of immature erythrocytes, isolation and lysis of hemosomes, and electrophoresis of the lysate supernatants, hemoglobin bands were obtained. This does not occur in bleeding anemia, in which reticulocytes contain mostly mitochondria.

These facts suggest that the final hemoglobin biosynthesis may occur in the hemosomes. A hypothesis of an association between mitochondrion and pre-hemosomal structures is discussed.

UNITERMS — Hemosome and hemoglobin biosynthesis.

INTRODUCTION

As was stated in the peripheral blood of rabbit-embryos, organelles increase in number at the reticulocytary stage (1).They were termed mitochondrion-like organelles (MLO) on account of their structural similarity to mitochondria, and because neither DNA nor aspects suggesting any division have been detected up to the present. This increase is due to the newly formed MLO which arise from the interrelation of smooth membranes with ferruginous micelles (2), incorporated by immature erythrocytes through pinocytosis (9). This results in the appearance of a pro-MLO followed by a definitive MLO, generally constituted by longitudinal lamellae (2). Size measurements of particles within the interlamellar space of the organelles and of particles dispersed in the hemoglobinized cytoplasm of immature embryo erytrocytes, as well as electrophoresis of the supernatant of the lysed fraction, showed that hemoglobin molecules are present within these organelles, for which the term hemosome has been proposed (3).

This paper shows that hemoglobin biosynthesis in reticulocytes of adult humans and of guinea-pigs, both with hemolytic regressive anemia, depends on

This research has been supported by the Conselho Nacional de Pesquisas, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and Fundo Especial de Despesas do Instituto Butantan.

Address: C.P. 65,/05504, São Paulo, Brasil.



the hemosomes, the same as occurs in immature erythrocytes of newborn and embryonic rabbits. The behavior of hemosomes during the maturation of reticulocytes, as well as a possible association between pre-hemosomal structures and mitochondrion, are discussed.

MATERIALS AND METHODS

1. *Blood from newborn and embryo-rabbits.*

Blood samples with about 20% reticulocytes were obtained from newborn-rabbits by cardiac puncture. Other samples were collected, sectioning the umbilical cord of 18-day-old rabbit-embryos, and were found to contain, besides definitive crytroroblasts and reticulocytes, a few primitive erythroblasts and erythrocytes.

2. *Bleeding anemias in guinea-pigs.*

Five to 6 ml of blood were withdrawn by daily cardiac puncture from 4 animals weighing 400 g, during 5 days; 2-3 days after the last bleeding, the blood samples contained 10-15% reticulocytes.

3. *Saponin-induced hemolytic anemia in guinea-pigs.*

Four animls, weighing 350 g, received daily subcutaneous 0.1 ml injections of 1% saponin in an isotonic sodium chloride solution, for 3 days; 4-5 days after the last injection, the blood samples contained 15 to 20% reticulocytes.

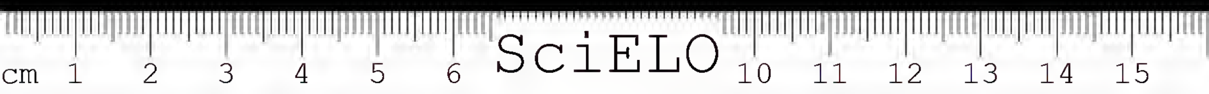
4. *Human blood.*

Two samples of venous blood from a patient with acquired hemolytic anemia presented a reticulocytosis of about 30%, and less than 1% erythroblasts.

Blood samples obtained by cardiac puncture were collected in a 2.5% v/v of an 1.0% EDTA and 1.0% sodium bicarbonate solutions, in equal volumes. All samples were supravitally stained with 0.1% brilliant cresyl blue in isotonic sodium chloride, in order to determine the reticulocyte percentage. To increase this concentration, the blood samples were submitted to centrifugation at 60Xg for 5 min; the supernatant contained about twice the inicial percentage of reticulocytes.

Hemolysis of blood smears.

Thin blood smears were prepared on collodion-coated histological slides and allowed to dry at room temperature for 18-20 h; hemolysis was performed in a 0,8% sodium chloride solution containing 2.5% formalin. The smears were then stained for 7 min. in an 1% aqueous phosphotungstic acid solution, washed in distilled water and dried at room temperature. The films were transferred



to copper grids and submitted to the shadow-casting process with palladium (4).

Fixation and embedding for thin sectioning.

1. All blood samples were fixed in 2% glutaraldehyde in Millonig's phosphate buffer (pH 7.3) (11) for 1 h, followed by fixation in 1% osmium tetroxido in the same buffer. After staining in an 1% aqueous uranyl acetate solution for 30 min., the blood was dehydrated and embeddel.

2. Other blood samples obtained from rabbit-embryos were fixed for 18-20 h in 10% formalin in 0.50% sodium chloride solution. After washing in 0.50% saline solution, staining was done in an 1% aqueous phosphotungstie acid solution for 1 h. Dehydration was initiated in 70% alcohol, containing 1% phosphotungstic acid, for about 10 min. at 4°C; then the staining continued for 2-3 h at room temperature in the same alcohol; dehydration finished in the alcohol series without staining.

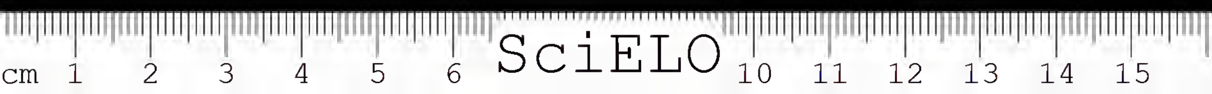
Araldite (10) and Polylite (5) were used as embedding media. Sections were obtained in a Porter-Blum MT-1 microtome and stained with lead citrate (12).

All preparations were examined in UM 100b and Elmiskop I electron microscopes with magnifications of X 1,300 to X 40,000, at 60 and 80 Kv.

Demonstration of hemoglobin within the organelles.

Immature red blood cells were fractionated, the organelles isolated and lysed according to the following procedure: 1. Blood is poured on 8-12 ml of a 0.153M NaCl, 0.005M KCl, 0.005M $MgCl_2$, 1 x 10^{-4}M EDTA and 0.04M phosphate buffer (pH 7.2). 2. Centrifugation of the cell suspension for 10 min at 200Xg, discarding of the supernatant, and resuspension of the sedimented cells (cell volumes: 0.6 — 2.0 ml) in 10-fold their volume of a 0.32M sucrose and 0.03 phosphate buffer. 3. Homogeneization in a Potter-Elvehjem tube at 1,000 rpm for 3 min at 4°C. Centrifugation of the homogenate at 1,350Xg, for 10 min. (sometimes steps 3 and 4 were repeated, resuspending the 1,350Xg sediment). 5. Centrifugation of the 1,350Xg supernatants, at 4°C, for 10 min. at 10,000Xg. 6. Resuspension of the organelle sediments in 0.32M buffered sucrose, and 5-fold washing of the fraction by sucessive resuspension and centrifugation at 10,000Xg for 10 min. The sediments were lysed by resuspension in 3-4 ml distilled water. 7. After the lysis was copleted, the suspensions were centrifuged at 19,000Xg for 20 min. The supernatants were used for electrophoresis, and the sediments were fixed and embedded for electron microscopic examination.

The supernatants of the lysed organelles and of the last washing medium were liophylized in a vacuum chamber, and later hydrated for electrophoresis. Diluted hemoglobins, obtained from the supernatants of 10,000Xg centrifugation (step 5), were used for comparisons. All samples were run on disc electrophoresis in polyacrylamide gel as described by Dietz and Lubrano (7). A



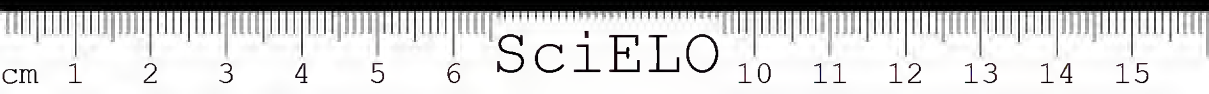
current of 2.5mA applied per tube for 40 min. at 5°C, and the hemoglobin bands were identified by benzidine reagent.

RESULTS

Morphological observations. Hemosomes are largely found in less mature reticulocytes and generally present two or three longitudinal lamellae. Their interlamellas space is filled with agglomerated hemoglobin molecules, which confers to the organelles a higher density than that of the hemoglobinized cytoplasm. They present diameters varying from 0.12 to 0.15μ (Figs. 1a and 1b) which increase to 0.20μ or more when the hemosomes present a higher number of hemoglobin molecules. The presence of these hemosomes is then only recognized by remains of the interlamellar space, as seen in Fig. 1c. The dense honeycomb-like body, or prohemosome, is continuous to a mitochondrion, as can be observed in Fig. 2a. In other instances, the region of continuity is slightly enlarged, and at the opposite extremity of the pro-hemosome a typical hemosome arises (Fig. 2b). Often hemoglobin molecules are also observed in the organelle extremity constituted by oblique or transverse lamellae (Fig. 2c). In figures 2a and 2b the organelles are highly electron dense due to phosphotungstic acid staining. These immature embryo erythrocytes, when examined in hemolysed smears, present filaments of different lenghts, whose diameters range from 0.11 to 0.21μ; erythroblast contain a lower number of filaments than reticulocytes (Figs. 3a and 3b).

Thin sections of reticulocytes of guinea-pigs with bleeding anemia show a high number of characteristic mitochondria measuring 0.25 to 0.30μ in diameter (Fig. 4a); pro-hemosome or hemosomes are rarely found. In hemolysed smears, filaments with 0.24 to 0.30μ in diameter or more were observed (Fig. 4b). Reticulocytes of saponin-induced hemolytic anemia in guinea-pigs, as well as reticulocytes, and a few erythroblasts, of the peripheral blood of a human with acquired hemolytic anemia, contain besides mitochondria, typical hemosomes (Fig. 1b) such as the ones found in immature embryo erythrocytes (Fig. 1a). Hemolysed blood smears show reticulocytes containing filaments whose diameters range from 0.13 to 0.33μ.

Organelle isolation and lysis. Electrophoresis. The pellets of 10,000Xg centrifugations, isolated from reticulocytes of newborn rabbits, embryo-rabbits, guinea-pigs with saponin-induced hemolytic anemia and a human with acquired hemolytic anemia, presented a rose-pink to reddish colour. The final pellets, after five washings with sucrose solution (Fig. 5a), turned to a brownish colour. After the osmotic lysis with distilled water (Fig. 5b) the sediments were clearly visible, although sprayed on the wall of the centrifuge tubes. The cell volumes obtained by centrifugation of the blood at 200Xg, after the concentration of reticulocytes, ranged from 0.60 to 0.85 ml. The pellets of the 10.000Xg centrifugation, isolated from reticulocytes of guinea-pigs with bleeding anemia presented a pale-yellow colour, even starting from a cell volume of 2.0 ml. After the osmotic lysis, the fine sprayed sediment was hardly visible.



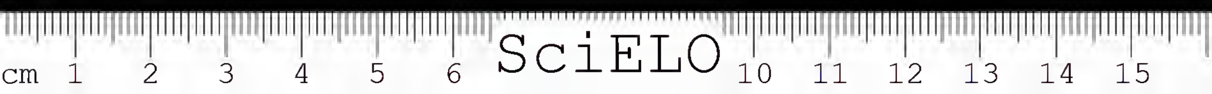
Disc electrophoresis in polyacrilamide gel of the concentrated last washing supernatants of all hemosomal fractions showed no visible band. No visible hemoglobin band was obtained from the supernatant of the mitochondrial fraction lysate of reticulocytes from bled guinea-pings. The supernatant of the hemosome lysate, corresponding to reticulocyte organelles from saponin-induced hemolytic anemia, showed two distinct hemoglobin bands, and the supernatant of hemosome lysates corresponding to newborn-rabbits, rabbit- embryos and human immature erythrocytes, presented only one sharp hemoglobin band (Figs. 6a and 6b).

DISCUSSION

The increase of filaments in reticulocytes, after extrusion of the nucleus by the orthochromatic erythroblast (1), as observed in hemolysed smears, (Figs. 3a and 3b) is due to "the rising of benzidine positive organelles (2), later termed hemosomes (3), and not a result from organelles division, as is the case of mitochondria. This increase may be correlated with the increase of the hemoglobin synthesis rate observed in anucleated immature erythrocytes (8, 13) and can be found also in the human peripheral blood.

Initially, pinocytotic vesicles, carrying ferruginous material, fuse among themselves and ferritin granules appear as simple clusters, later surrounded by a double membrane; the ferruginous clusters turn into dense bodies by the gradual disappearence of the ferritin granules. The dense bodies transform themselves in honeycomb-like bodies, or pro-hemosomes, giving rise to the definitive hemosomes (2). They contain hemoglobin molecules within the generally longitudinal interlamellar space, as was demonstrated through fractionation of reticulocytes, organelle isolation (Fig. 5a), lysis (Fig. 5b), and electrophoresis of the lysate supernatant (Fig. 6a). When hemosomes are filled to a high degree with hemoglobin molecules, or are "mature", the hemoglobin spreads out to the cytoplasm in consequence of the disruption of internal and external membranes of the organelle (Fig. 1c). The extremely variable disposition of hemosomes, found in hemolysed erythroblasts and reticulocytes, are possible due to their dislocation in the cytoplasm of the living cells, thus explaining the uniformity of hemoglobin distribution. Comparable results were achieved from erythroblasts and pro-erythrocytes of 16-day-old chick-embryos blood, concerning the presence of hemosomes, and obtainment of hemoglobin bands throngs electrophoresis of the supernatant of their lysate (6).

It is difficult to explain the way by which the hemosomes grow, since neither DNA nor RNA have yet been detected in these organelles, and how the energy for final hemoglobin synthesis is supplied. Hypothetically, an association between mitochondria and pro-hemosomes might provide the necessary conditions for hemosome growth and their possible biosynthesis function, as suggest Figs. 2a and 2b. Subsequently, mitochondria may behave as hemosomes (Fig. 2e).



First, to verify if in reticulocytes of adult animals with regressive anemia hemoglobin biosynthesis is conditioned by the presence of hemosomes, guinea-pigs were submitted to successive bleedings. But, reticulocytes present only typical mitochondria, and rare hemosomes (Fig. 4a); no visible hemoglobin band was obtained through electrophoresis of the supernatant of the lysed mitochondrial fraction. Anemia induced under these conditions, causes insufficiency of iron, protein as well as other factors, and in consequence, recuperation proceeds slowly. Through hemolysis of partially dried smears (4) a marked difference in diameters is evident between hemosomal (Fgs. 3a and 3b) and mitochondrial (Fig. 4b) filaments of reticulocytes from rabbit-embryos and guinea-pigs with bleeding anemia, respectively. The former vary from 0.11 to 0.21μ; mitochondria diameters vary from 0.24 to 0.30μ. Correspondingly, this marked difference is also observed in sections (Figs. 1a and 4a).

In hemolytic anemias, as the one induced in guinea-pigs by daily injections of a saponin solution, no iron, protein and other material necessary for the biosynthesis of hemoglobin are withdrawn. Sections of reticulocytes show typical hemosomes, besides mitochondria, and hemolysed reticulocytes contain filaments ranging from 0.15 to 0.37μ in diameter. Electrophoresis from the supernatant of the lysed hemosomal fraction showed two distinct hemoglobin bands. Similar results were obtained with the blood from the patient with acquired hemolytic anemia, whose reticulocytes show also typical hemosomes (Fig. 1b); filaments with 0.11 to 0.33μ in diameter were found in hemolysed reticulocytes, and one sharp hemoglobin band was obtained by electrophoresis of the supernatant of the lysed hemosomal fraction (Fig. 6b).

The above results suggest that the final hemoglobin biosynthesis may take place within the hemosomes. Positive benzidine reaction (2) demonstrated the presence of heme in the course of their formation. Globin, synthesized in polysomes (14, 15), could be already present during the growth of hemosomes, combining to heme within the organelle (2). This does not occur when elements necessary for hemoglobin biosynthesis are insufficient. Consequently, reticulocytes contain only mitochondria, and there scarcely ever occurs hemosome genesis, ,as happens in bleeding anemia. In reticulocytes of adults with hemolytic regressive anemias the cytological modifications observed during maturation are the same as in immature embryo erythrocytes.

RESUMO — Hemossomos são organelos quo aumentam em número na fase reticulocitária no sangue periférico de embriões de coelho, e do homem e cobaios adultos nas anemias hemolíticas regressivas. Através do fracionamento de eritrócitos imaturos, isolamento e lise dos hemossomos, eletroforese dos sobrenadantes dos lisados da fração, foram obtidas bandas de hemoglobina. Na anemia provocada por sangrias, em que os reticulócitos não contêm praticamente hemossomos, mas apenas mitocôndrios, nem mesmo traços de bandas de hemoglobina são obtidos.

Estes fatos sugerem que a biossíntese final da hemoglobina pode ocorrer nos hemossomos. Uma hipótese sobre a possível associação entre estruturas pre-hemossômicas e o mitocôndrio é discutida.

UNITERMOS — Hemossomo e biossíntese de hemoglobina.

ACKNOWLEDGEMENTS

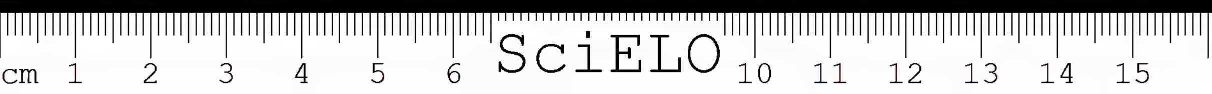
The authors wish to thank Mrs. Vera Mondin Weisz, Mr. Alipio Silva Gonzales and Mr. Heitor Costa for their excellent technical assistance. And Mrs. Sibylle Heller for her editorial aid and translation.

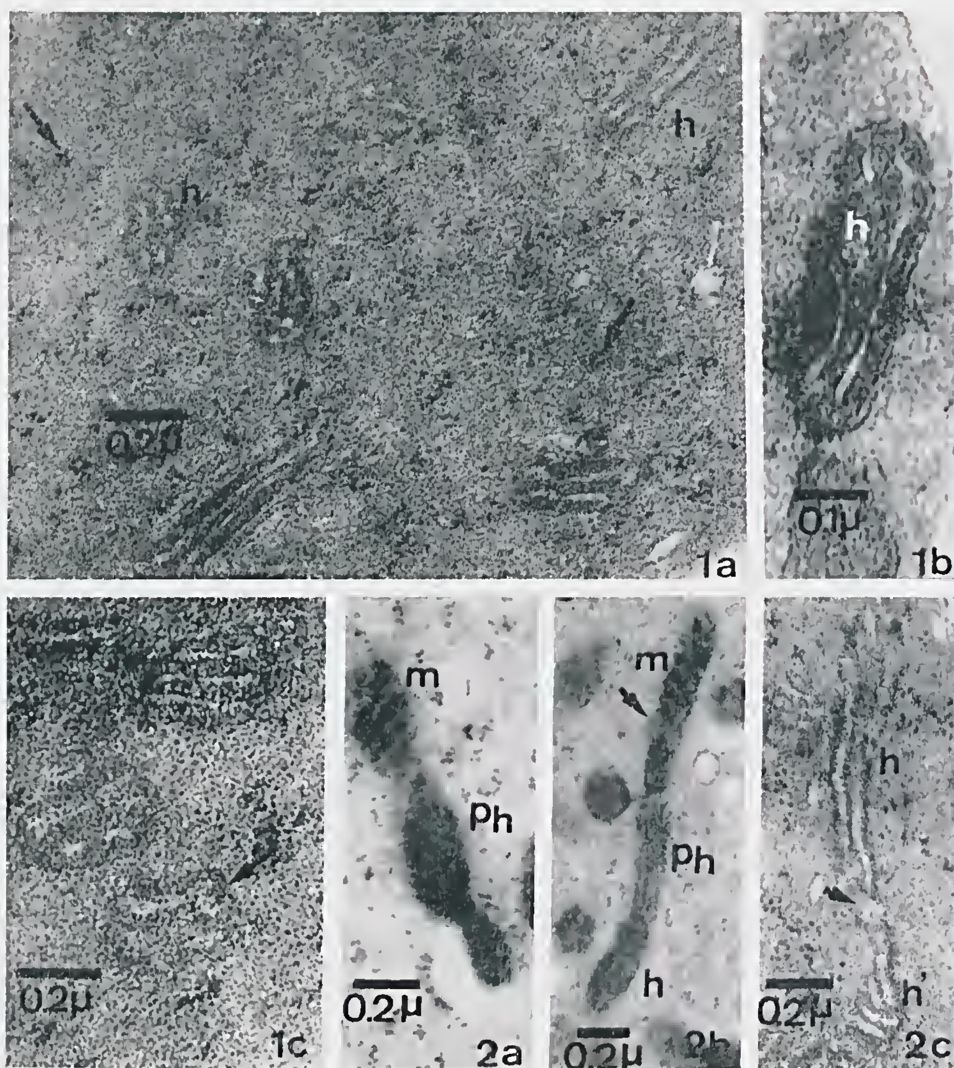
The human blood samples were obtained through courtesy of Dr. Gastão Rosenfeld, Director of the Laboratório de Hematologia Clínica, São Paulo, Brasil.

REFERENCES

1. BRUNNER JR., A. — Increase of mitochondria at the reticulocytary stage. *Ciência e Cultura, 24*: 468-476 (1972).
2. BRUNNER JR., A. & MOMBRUB, I. C. — Genesis of mitochondrionlike organelles in reticulocytes of rabbit-embryo blood. *Ciência e Cultura, 24*: 448-451 (1972).
3. BRUNNER JR., A., SCHWANTES, A. R., SCHWANTES, M. L. & BEÇAK, W. — Hemoglobin in immature erythrocyte mitochondrion-like organelles. *Experientia, 28*: 569-571 (1972).
4. BRUNNER JR., A. & VALLEJO-FREIRE, A. — Electron microscopic observations on granules and filaments (reticulosomes) of reticulocytes. *Exp. Cell Res.,* 10(1): 55-62 (1956).
5. COIRO, J. R. R. & BRUNNER JR., A. — Polylite 8001: A new embedding medium for electron microscopy. *Rev. Microsc. Electr.,* 1(1): 12 (1972).
6. COIRO, J. R. R., BRUNNER JR., A., SCHWANTES, M. L. & SCHWANTES. A. R. — Hemoglobin in mitochondrion-like organelles of immature chick-embryo erythrocytes. Mem. Inst. Butantan, 37: 327-334, 1973.
7. DIETZ, A. A. & LUBRANO, T. — Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc electrophoresis, *Anal. Biochem.,* 20: 246-257 (1967).
8. FANTONI, A., DE LA CHAPELLE, A., RIFKIND, R. A. & MARKS, P. A. — Erythroid cell development in fetal mice: Synthetic capacity for different proteins. *J. Mol. Biol.,* 33(1): 79-91 (1968).
9. JONES, O. P. — Selective binding sites for the transfer of ferritin into erythroblasts. I. Preliminary report. *J. Nat. Cancer Inst.,* 35: 139-151 (1965).
10. LUFT, J. — Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophy. Biochem. Cytol.,* 9: 409-414 (1961).
11. MILLONIG, G. — Advantages of a phosphate buffer of OsO_4 solutions in fixations. (Abstract). *J. Appl. Phys.,* 32(8): 1.637 (1961).
12. REYNOLDS, E. S. — The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.,* 17: 208-212 (1963).
13. SENO, S. The structure and the function of reticulocyte. *Acta Haem. Jap.,* 21: 171-181 (1958).
14. WARNER, J. R., RICH, A. & HALL, C. E. — Electron microscope studies of ribosomal clusters synthesizing hemoglobin. *Science,* 138: 1.399-1.403 (1962).
15. WARNER, J. R., KNOFF, P. M. & RICH, A. — A multiple ribosomal structure in protein synthesis. *Prof. Nat. Acad. Sci.,* 49: 122-129 (1963).

Recebido para publicação em 26.X.1974
Aceito para publicação em 26.XI.1974





Thin sections of adult human (Fig. 1b) and rabbit-embryo reticulocytes (Figs. 1a, c, 2a, b and c). Glutaraldehyde/OsO_4 fixation: Figs. 1a, b, c and 2c; formalin fixation and phosphotungstic acid staining: Figs. 2a and b.

Fig. 1a — Several hemosomes (h) slightly more electrondense than the cytoplasm are seen. Two of them are longitudinally sectioned. Polyribosomes (arrows) are diffusely distributed.

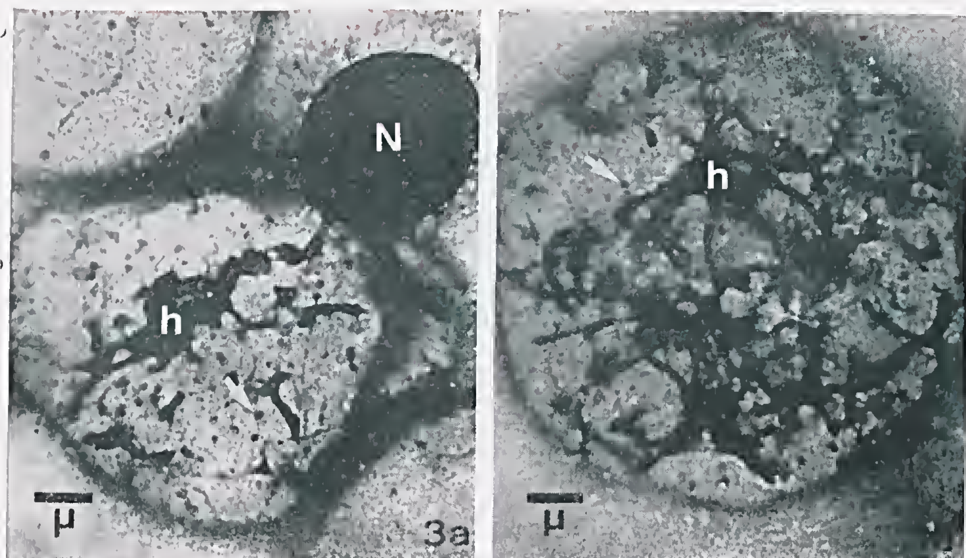
Fig. 1b — A typical hemosome (h), constituted by longitudinally disposed double lamellae and limited by an external membrane.

Fig. 1c — Three "mature" hemosomes completely filled with hemoglobin molecules, which confounds them with the hemoglobinized cytoplasm. From one hemosome, hemoglobin molecules spread out to the cytoplasm (arrow).

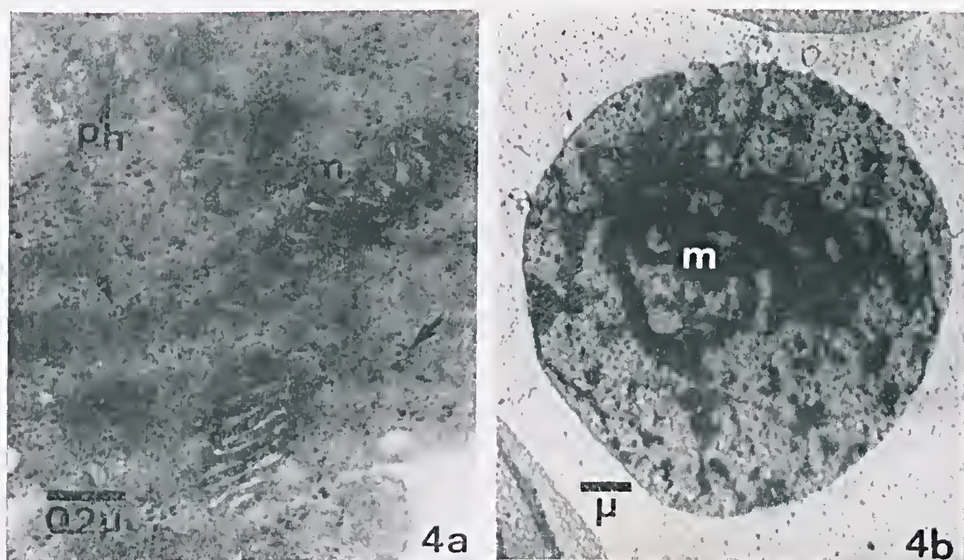
Fig. 2a — A honeycomb-like organelle or pro-hemosome (ph) is continuous to a mitochondrion (m), suggesting a possible association between these organelles.

Fig. 2b — Continuous with the extremities of a long pro-hemosome (ph), a hemosome (h) and a mitochondrion (m) are seen. The region of connection between *ph* and *m* is slightly enlarged (arrow).

Fig. 2c — The long hemosome (h) is continuous to a hemosome constituted by transverse and oblique lamellae (h') which could have been a mitochondrion. A dilatation between *h* and *h'* can be observed (arrow).



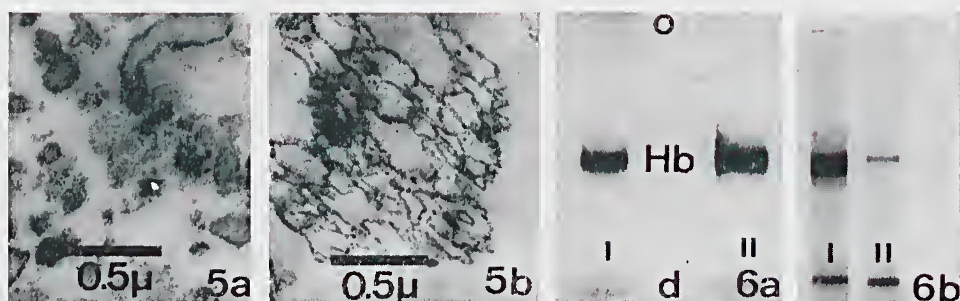
Figs. 3a and 3b — Hemolysed orthochromatic rabbit — embryo erythroblast, extruding its nucleus (N) and reticulocyte, respectively. Filamentous and rod-shaped hemosomes (h), and polyribosomes (arrow) are observed.



Reticulocytes of guinea-pigs with bleeding anemia.

Fig. 4a — Thin section showing mitochondria (m) of higher diameters than hemosomes, and polyribosomes (arrows). Pro-hemosomes (ph) and hemosomes are rarely found.

Fig. 4b — Hemolysed reticulocyte presenting filamentous and rod-shaped mitochondria (m) of higher diameters than filamentous hemosomes of Figs. 3a and 3b.



Sections of hemosomes obtained from reticulocyte fractionation.

Fig. 5 — After five washings; lamellae were not preserved.

Fig. 5b — After osmotic lysis for electrophoresis of the supernatant.

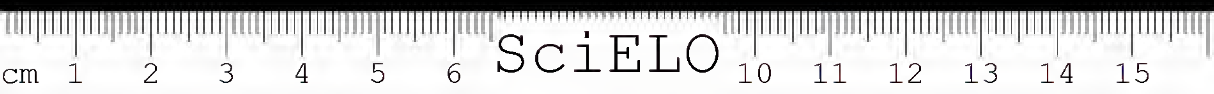
Electrophoresis patterns of the hemoglobin from the supernatants of 10,000Xg centrifugation (I) and from hemosome content (II); *o* — origin; *Hb* — hemoglobin; *d* — dye.

Fig. 6a — From rabbit-embryo reticulocytes.

Fig. 6b — From reticulocytes of humans with acquired hemolytic anemia.

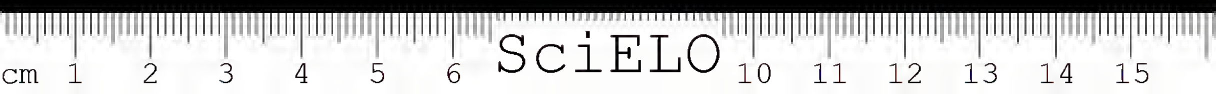
ÍNDICE DE AUTORES

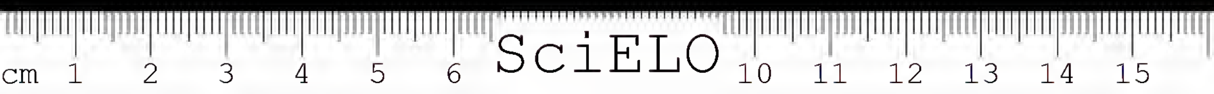



cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

ÍNDICE DE ASSUNTOS




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15